

木质素过氧化物酶 (Lignin peroxidase, Lip) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

木质素过氧化物酶 (EC1.11.1.14) 是一种含亚铁血红素的过氧化物酶，属于木质素降解酶系，在木质素生物降解、造纸工业、纺织工业、芳香化合物转化与降解及环境污染控制等方面具有较大的应用潜力。

测定原理：

木质素过氧化物酶催化天青脱甲基，在 651nm 处测定吸光值减少。

试剂组成和配制：

| 产品名称 | OT032-50T/48S | Storage |
|--------|---------------|---------|
| 试剂一：粉剂 | 1 瓶 | 4°C |
| 试剂二：液体 | 12ml | 4°C避光 |
| 试剂三：液体 | 12ml | 4°C |
| 说明书 | 一份 | |

试剂一：粉剂×1 瓶，4°C保存；临用前加入 80ml 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4°C保存 1 个月；

需自备仪器和用品：

天平、研钵、低温离心机、分光光度计、1 ml 玻璃比色皿、可调式移液器、冰。

酶液提取：

1、组织：按照质量 (g) : 试剂一体积(ml)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g, 加入 1ml 试剂一) 加入试剂一，冰浴匀浆后于 4°C, 10000g 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

2、细胞：按照细胞数量 (10⁴ 个) : 试剂一体积 (ml) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1ml 试剂一)，冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min) ; 然后 4°C, 10000g 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

3、培养液或其它液体：直接检测。

测定步骤：

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 651nm，蒸馏水调零。

2、临用前按每个样本试剂一：试剂二：试剂三= 400:200:200 (μl) 的比例配制工作液，现配现用。

3、在 1ml 玻璃比色皿中依次加入如下试剂



| | |
|----------|-----|
| | 测定管 |
| 样品 (μl) | 200 |
| 工作液 (μl) | 800 |

充分混匀，立即测定 651nm 处 10s 和 130s 吸光值，记为 A1 和 A2， $\Delta A = A1 - A2$

酶活计算公式：

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每 mg 组织蛋白在每 ml 反应体系中每分钟 A651 变化 0.02 为一个酶活力单位。

$$\text{LiP 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.02 \div T = 125 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每 g 组织在每 ml 反应体系中每分钟 A651 变化 0.02 为一个酶活力单位。

$$\text{LiP 活性 (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.02 \div T = 125 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每 1 万个细菌或细胞在每 ml 反应体系中每分钟 A651 变化 0.02 为一个酶活力单位。

$$\text{LiP 活性 (U/104 cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.02 \div T = 0.25 \times \Delta A$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每 ml 血清（浆）在每 ml 反应体系中每分钟 A651 变化 0.02 为一个酶活力单位。

$$\text{LiP 活性 (U/ml)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.02 \div T = 125 \times \Delta A$$

V 反总：反应总体积，1ml；V 样：反应中样本体积，0.2ml；V 样总：加入提取液体积，1ml；Cpr：样本蛋白浓度，mg/ml；W：样本质量，g；T：反应时间，2min

