



漆酶检测试剂盒 Laccase Assay Kit

微量法

产品编号: AK476M
产品规格: 100T/48S
产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES476	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK476-A	30mL×1 瓶	4℃保存;
AK476-B	粉剂×1 瓶	4℃避光保存, 临用前加10mL AK476- A溶解; 一周内有效。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 漆酶 (Laccase; CE1.10.3.2) 是一种含铜的多酚氧化酶, 属于铜蓝氧化酶家族, 广泛分布于真菌和高等植物中, 具有较强的氧化还原能力, 在纸浆生物漂白, 环境污染物降解和木质纤维素降解以及生物检测方面有非常广泛的应用。

原理: 漆酶分解底物 ABTS 产生 ABTS 自由基, 在 420nm 处的吸光系数远大于底物 ABTS, 测定 ABTS 自由基的增加速率, 可计算得漆酶活性。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、天平、低温离心机、恒温水浴锅。

粗酶液提取

1. 组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES476), 进行冰浴匀浆。12000g 4℃离心 30min, 取上清, 置冰上待测。
2. 细胞: 按照细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL ES476), 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℃, 10000g 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
3. 培养液: 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 420nm。
2. 样本测定: 在微量石英比色皿/96 孔板中加入下列试剂

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
样品	45	45
AK476-A	255	
AK476-B		255

60℃水浴 20min 后冷却至室温, 取 200μL 反应液于微量石英比色皿/96 孔板中测定 420nm 处吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$

注意事项:

1. 极少数样本在 60℃水浴 20min 后会出现沉淀, 可经过 8000g 25℃离心 10min 后, 取上清检测, 例如成熟的水稻叶片样本。
2. 为确保检测准确性, 若 ΔA 大于 2, 将样本用提取液稀释 2~10 倍后重新检测, 计算公式乘以相应稀释倍数。

酶活性计算公式:

- a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 9.26 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每克样品每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times W \div V \text{ 样总}) \div T = 9.26 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每 10^4 个细胞每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min /} 10^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{细胞数量} \div V \text{ 样总}) \div T = 9.26 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每升培养液每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min /L)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T = 9260 \times \Delta A$$

注：ε：ABTS 毫摩尔消光系数：36L/mmol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应总体积，0.3mL；V 样：反应体系中样本体积，0.03mL；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，20min。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

b. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 18.52 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每克样品每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min /g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times W \div V \text{ 样总}) \div T = 18.52 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每 10^4 个细胞每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min /} 10^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{细胞数量} \div V \text{ 样总}) \div T = 18.52 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每升培养液每分钟氧化 1nmol 底物 ABTS 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{漆酶活性 (nmol/min /L)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T = 18520 \times \Delta A$$

注：ε：ABTS 毫摩尔消光系数：36L/mmol/cm；d：比色皿光径，0.5cm；V 反总：反应总体积，0.3mL；V 样：反应中样本体积，0.045mL；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，20min。