

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

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

自备实验用品及仪器：

天平、研钵、低温离心机、酶标仪、96 孔板、可调式移液器、冰。

试剂组成和配制：

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃保存。临用前加入 115mL 蒸馏水，充分溶解待用，用不完的试剂 4℃保存一个月。

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体 5mL×1 支，4℃保存。

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℃，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℃，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。

测定操作：

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 651nm。
- 2、临用前按每个样本试剂一：试剂二：试剂三=80:40:40（ μ L）的比例配制工作液，现配现用。
- 3、在 96 孔板中依次加入如下试剂

	测定管
样品（ μ L）	40
工作液（ μ L）	160
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 0.01 为一个酶活力单位。

LiP 活性（U/mg prot）= $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.01 \div T = 250 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

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 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{LiP 活性 (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 250 \times \Delta A \div W$$

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 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{LiP 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 0.5 \times \Delta A$$

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 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{LiP 活性 (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T = 250 \times \Delta A$$

V 反总：反应总体积，0.2mL；V 样：反应中样本体积，0.04mL；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