

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

## （紫外分光法 48 样）

### 一、产品简介：

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。

木质素过氧化物酶（LiP）氧化藜芦醇生成藜芦醛，藜芦醛在 310nm 处有特征吸收峰。通过测定 310nm 处的藜芦醛的增加速率，即可得到木质素过氧化物酶（LiP）酶活性大小。

### 二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体μL×1 瓶	4℃保存	临用前用前甩几下使液体落入底部，再加 9mL 蒸馏水混匀备用。
试剂二	液体μL×1 支	4℃保存	临用前用前甩几下使液体落入底部，取 2 个新的 EP 管，每管取 3.3ul 液体，再加 2mL 蒸馏水混匀备用。

### 三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、天平、研钵、低温离心机、可调式移液器。

### 四、木质素过氧化物酶（Lip）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### ① 组织样本：

取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

**【注意】** 若样本颜色较深（如植物叶片），可引起起始值 A1 值较大如超过 1.5，可在样本制备过程中增加除色素步骤：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 80%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

##### ② 细菌或培养细胞：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；4℃×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

**【注】** 若增加样本量，可按照数量（10<sup>4</sup>）：提取液体积（mL）为 500-1000：1 的比例进行提取

③ 液体样本：若是澄清液体，直接检测，若液体样本浑浊，需 4℃×12000rpm，离心 10min，取上清液检测。

#### 2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 310nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂至常温状态（25℃）。

③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
提取液	480
样本上清液	80
试剂一	160
试剂二	80
充分混匀, 30°C条件下, 10s 时于 310nm 处读取 A1, 5min 后再读取 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】: 若 $\Delta A$  在零附近, 可增加取样质量 W (如增至 0.2g 或更多), 或增加样本加样体积 V1 (如增至 200μL 或更多, 则加样体系中提取液相应减少), 或延长反应时间 T (由 5min 增加至 10min 或更长), 则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算:

1. 按照蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{LiP 活性(nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 215.1 \times \Delta A \div Cpr$$

2. 按照样本质量计算:

酶活定义: 每克样品每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{LiP 活性(nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 215.1 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算:

酶活定义: 每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

$$\begin{aligned} \text{LiP 活性(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \\ &= 215.1 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算:

酶活定义: 每毫升培养液每分钟氧化 1nmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{LiP 活性(nmol/min/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 215.1 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---藜芦醛摩尔消光系数: 9300L/mol/cm;

d---比色皿光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---反应中样本体积, 0.08mL;

V2---反应总体积, 0.8mL=8×10<sup>-4</sup>;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 5min

Cpr---样本蛋白浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。