

## 木质素过氧化物酶 (Lip) 检测试剂盒 (微量法)

**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。

### 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。

### 粗酶液提取：

- 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。
- 细胞：**按照细胞数量 ( $10^4$  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。
- 培养液或其它液体：**直接检测。

### 测定步骤：

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

	测定管
样品 ( $\mu\text{L}$ )	40
工作液 ( $\mu\text{L}$ )	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。

$$\begin{aligned}\text{LiP 活性 (U/mg prot)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.01 \div T \\ &= 250 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

### 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。

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

### 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。

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

### 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。

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

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