漆酶（Lac）活性检测试剂盒说明书

规格：96 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。

2. 正式检测前选取 2~3 个样本进行预检测，若ΔA 大于 1，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。

3. 本试剂盒仅用于科研。

4. 极少数样本在 60℃水浴 20 min 后会出现沉淀，可经过 8000 g，室温离心 10 min 后，取上清检测。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
提取液	105 mL×1	4℃	
试剂一	54 mL×1	4℃	
工作液	粉剂×1	4℃避光	临用前加 27 mL 试剂一溶解；用不完的试剂 4℃保存一周。

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

四、样品制备

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后，12000 g，4℃，离心 30 min，置于冰上，上清为待测样本。

2. 细菌/细胞：按照细菌/细胞数量（10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300 W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3 min）；然后 10000 g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

3. 液体样本：澄清的液体的样本直接测定，若浑浊则离心后取上清液检测。

五、测定步骤

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 420 nm 处。

2. 在 1.5 mL 离心管中依次加入：

	测定管	对照管
样本（μL）	45	45
试剂一（μL）	-	255
工作液（μL）	255	-
充分混匀后，60℃水浴 20 min 后冷却至室温，取 200 μL 反应液于 96 孔板中测定 420 nm 处吸光值 A，记 A 测定、A 对照，ΔA=A 测定-A 对照。每个测定管需设一个对照管。（极少数样本在 60℃水浴 20 min 后会出现沉淀，可经过 8000g 常温离心 10 min 后，取上清检测）		

六、计算

1. 按照液体样本体积计算：

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

漆酶活性（nmol/min/L）=ΔA÷（ε×d）×V 反总÷V 样÷T=15430×ΔA

2. 按照样本质量计算：

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

漆酶活性（nmol/min/g 鲜重）=ΔA÷（ε×d）×V 反总÷（V 样×W÷V 提取）÷T=15.43×ΔA÷W

3. 按照蛋白质浓度计算（需另测蛋白浓度）：

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

漆酶活性（nmol/min/mg prot）=ΔA÷（ε×d）×V 反总÷（V 样×Cpr）÷T=15.43×ΔA÷Cpr

4. 按细菌/细胞数量计算：

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

漆酶活性（nmol/min/10^4cell）=ΔA÷（ε×d）×V 反总÷（V 样×N÷V 提取）÷T=15.43×ΔA÷N

ε：底物，2,2'-联氮-双-（3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸）二铵盐毫摩尔消光系数：36 L/mmol/cm；d：比色皿光径，0.6 cm；V 反总：反应总体积，0.3 mL；V 样：反应中样本体积，0.045 mL；V 提取：加入提取液体积，1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W，样本质量，g；T：反应时间，20 min

七、产品简介

漆酶是一类含铜多酚氧化酶，广泛存在于植物、真菌及微生物体内。该酶可催化木质素、酚类物质的氧化降解与聚合反应，参与植物木质素代谢、次生代谢

调控及环境污染物降解过程，在植物细胞壁发育、抗病防御及微生物物质转化中发挥重要作用，是评价木质素代谢与多酚氧化代谢水平的重要生理指标。