

多功能氧化酶（mixed function oxidase, MFO）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

多功能氧化酶又称混合功能氧化酶，可产生降解反应，可使原化学物质变为低毒的或无毒的物质从体内排出；还可产生激活反应，可使原化学物质转化为具有亲电子性质，导致毒性增强，成为致突变物或终致癌物。近年来对混合功能氧化酶系与外源性化学物质相互作用的深入研究，对于从分子生物学水平上进一步了解外源性化学物质的毒作用具有重要意义。

测定原理：

MFO催化对硝基苯甲醚产生对硝基苯酚，在400nm下有特征吸光值。

自备用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96孔板、研钵、冰、蒸馏水、氯仿。

试剂组成和配制：

提取液：液体120mL×1瓶，4°C保存；

试剂一：液体24mL×1瓶，4°C避光保存；

试剂二：粉剂×3管，-20°C保存；临用前取一管加入1.5mL水溶解，现配现用。

试剂三：液体24mL×1瓶，4°C保存；

试剂四：液体64mL×1瓶，4°C保存。

粗酶液提取：

按照组织质量（g）：提取液（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。12000g 4°C离心20min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1. 酶标仪预热30min以上，调节波长至400nm。
2. 在EP管中依次加入如下试剂

试剂名称（ μ L）	测定	空白
试剂一	200	200
试剂二	40	40
提取液	160	360
样本	200	
混匀，37°C水浴30min		

试剂三	200	200
-----	-----	-----

分别加入1000 μ L氯仿，充分混匀萃取，静置10min，取下层氯仿层0.6mL至新的EP管中。再加入试剂四0.6mL，充分混匀萃取，取上层水相0.2mL于96孔板中，400nm下测定吸光值A测定与A空白， $\Delta A=A_{测定}-A_{空白}$ 。空白管只需测一管。

MFO活性计算：

标准曲线： $y = 0.0119x + 0.0021$ ， $R^2 = 0.9997$ ；y，吸光度；x，标准品浓度，单位nmol/mL。

1. 按样本质量计算

单位定义：每g样本每分钟产生1nmol对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{MFO (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.0021) \div 0.0119 \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 8.4 \times (\Delta A - 0.0021) \div W \end{aligned}$$

2. 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟产生1nmol对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{MFO (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A - 0.0021) \div 0.0119 \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 8.4 \times (\Delta A - 0.0021) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

$V_{\text{总}}$ ：最终萃取液体积，0.6 mL； $V_{\text{样}}$ ：反应中样品体积，200 μ L；T：反应时间，30min；W：样品质量，g； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL。