

锰过氧化物酶（Manganese peroxidase, Mnp）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

锰过氧化物酶（EC1.11.1.13）是一种含亚铁血红素的过氧化物酶，主要存在于担子菌中，属于木质素降解酶系，能有效的降解木质素及废水和土壤中比较难降解的氯化物，叠氮化合物、DTT，多环芳烃等。

测定原理

锰过氧化物酶在Mn²⁺存在的条件下，将愈创木酚氧化为四邻甲氧基连酚，在465nm有特征吸收峰。

自备实验用品及仪器

天平、研钵、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、恒温水浴锅。

试剂组成和配制

试剂一：液体110mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：液体2mL×1支，4°C保存。

试剂三：液体5mL×1瓶，4°C避光保存。

试剂四：液体2mL×1支，4°C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°C，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°C，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. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至465nm，蒸馏水调零。
2. 测定前将试剂一、二、三、四在37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）放置10min以上。
3. 样本测定表

试剂名称（ μ L）	测定管
样本	20
试剂一	100
试剂二	20
试剂三	40
试剂四	20

在微量石英比色皿或96孔板中按顺序加入上述试剂，立即混匀并计时，记录465nm下30s时的吸光值A1和2min30s后的吸光值A2。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意：若一次性测定样本较多，可将试剂一、二、三、四按比例配成混合液，在37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）放置10min以上，测定时加入20 μ L样本和180 μ L混合液测定。

酶活计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每毫克蛋白每分钟氧化1nmol愈创木酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{MnP活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 413 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每克样品每分钟氧化1nmol愈创木酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{MnP活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 413 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每104个细胞每分钟氧化1nmol愈创木酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{MnP活性 (nmol/min/104 cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 413 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每毫升培养液每分钟氧化1nmol愈创木酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{MnP活性 (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 413 \times \Delta A$$

ϵ : 愈创木酚摩尔消光系数: 12100L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 2×10^{-4} L; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 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

b. 用96孔板测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每毫克蛋白每分钟氧化1nmol愈创木酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{MnP活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 826 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每克样品每分钟氧化1nmol愈创木酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{MnP活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 826 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每104个细胞每分钟氧化1nmol愈创木酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{MnP活性 (nmol/min/104 cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 826 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每毫升培养液每分钟氧化1nmol愈创木酚所需的酶量为一个酶活力单位。

MnP活性 (nmol/min/mL) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 826 \times \Delta A$

ϵ : 愈创木酚摩尔消光系数: 12100L/mol/cm; d: 96孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 2×10^{-4} L; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 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

www.affandi-e.com