

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

锰过氧化物酶 (MnP) 检测试剂盒说明书

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

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

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体110mL×1瓶	4℃保存	-
试剂二	液体2mL×1支	4℃保存	-
试剂三	液体4mL×1瓶	4℃避光保存	-
试剂四	液体2mL×1支	4℃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℃，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℃，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

	对照管	测定管
试剂一 (μL)	120	100
试剂二 (μL)		20
试剂三 (μL)	40	40
样品 (μL)	20	20
试剂四 (μL)	20	20

充分混匀，于30℃反应10min，于微量石英比色皿/96孔板，测定465nm处吸光值，记为A对照管和A测定管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$

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。

$$\text{MnP 活性 (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 83 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{MnP 活性 (nmol/min/g)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 83 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每 10^4 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。

$$\text{MnP 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T = 83 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每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。

$$\text{MnP 活性 (nmol/min/L)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 8.3 \times 10^4 \times \Delta A$$

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，1mL； $V_{\text{样}}$ ：反应中样本体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：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，10min

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。

$$\text{MnP 活性 (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 166 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{MnP 活性 (nmol/min/g)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 166 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每 10^4 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。

$$\text{MnP 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T = 166 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每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。

$$\text{MnP 活性 (nmol/min/L)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 1.66 \times 10^5 \times \Delta A$$

ε ：愈创木酚摩尔消光系数：12100L/mol/cm；d：比色皿光径，0.5cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，1mL； $V_{\text{样}}$ ：反应中样本体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：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，10min