

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0809

Size: 50T/24S

锰过氧化物酶 (MnP) 检测试剂盒说明书

分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、测定原理:

锰过氧化物酶在 Mn^{2+} 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。

三、需自备的仪器和用品:

天平、研钵、低温离心机、可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、恒温水浴锅。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 75mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4°C 避光保存	
试剂四	液体 5mL×1 瓶	4°C 保存	

五、操作步骤：

● 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。

	对照管	测定管
试剂一 (μL)	600	500
试剂二 (μL)		100
试剂三 (μL)	200	200
样品 (μL)	100	100
试剂四 (μL)	100	100

充分混匀，于 37℃ 反应 10min，于 1mL 玻璃比色皿，蒸馏水调零，测定 465nm 处吸光值，记为 A 对照管和 A 测定管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

六、酶活计算公式

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。

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

$$= 83 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

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

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。

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

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。

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

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； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL； W ：样本质量，g； T ：反应时间，10min。