

锰过氧化物酶 (Manganese peroxidase, Mnp) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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：

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 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。

试剂组成和配制：

| 产品名称 | OT030-50T/48S | Storage |
|--------|---------------|---------|
| 试剂一：液体 | 75ml | 4°C |
| 试剂二：液体 | 5ml | -20°C |
| 试剂三：液体 | 11ml | 4°C避光 |
| 试剂四：液体 | 5ml | 4°C |
| 说明书 | 一份 | |

需自备仪器和用品：

天平、研钵、低温离心机、可见分光光度计、1 ml 玻璃比色皿、恒温水浴锅。

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。

测定步骤：

- 1、分光光度计预热 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。

| 试剂名称 (μl) | 测定管 |
|-----------|-----|
|-----------|-----|

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



| | |
|-----|-----|
| 样本 | 100 |
| 试剂一 | 500 |
| 试剂二 | 100 |
| 试剂三 | 200 |
| 试剂四 | 100 |

在 1 ml 玻璃比色皿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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意事项

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 100 μ l 样本和 900 μ l 混合液测定。

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。

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

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。

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

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。

$$\text{MnP 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T = 413 \times \Delta A \div$$

细胞数量

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_{反总}: 反应总体积, 1×10⁻³L;
V_样: 反应中样本体积, 0.1ml; V_{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, 2min

