

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

### 微量法 100T/96S

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	OT031-100T/96S	Storage
试剂一: 液体	110ml	4°C
试剂二: 液体	2ml	4°C
试剂三: 液体	5ml	4°C避光
试剂四: 液体	2ml	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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、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 (10<sup>4</sup> 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
-----------	-----



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  $\Delta A = A2 - A1$ 。

## 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 20 $\mu$ l 样本和 180 $\mu$ 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。

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

#### 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 10<sup>4</sup> 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。

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

#### 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。

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

$\epsilon$ : 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 $\times$ 10<sup>-4</sup> 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;  $C_{\text{pr}}$ : 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。

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

#### 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。

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

#### 3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每 10<sup>4</sup> 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。



$$\text{MnP 活性 (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 826 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

#### 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。

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

$\epsilon$ : 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,  $2 \times 10^{-4}$  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;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度, mg/ml;  $W$ : 样本质量, g;  $T$ : 反应时间, 2min。

