

多功能氧化酶 (MFO)活性测定说明书

(货号: G0915W 微板法 96 样)

一、产品简介:

多功能氧化酶 (MFO)是生物体内重要的一种解毒酶,可使昆虫适应植物的变化;减弱或免受植物诱导抗性产生的有毒次生物质对昆虫的毒害。

多功能氧化酶 (MFO)催化对硝基苯甲醚产生对硝基苯酚,该产物在 405nm 下有特征吸收峰,通过检测该物质在 405nm 处的光吸收增加速率,进而得出 MFO 活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	提取液 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×2 支	4℃保存	每支使用前甩几下使试剂落入底部,分别加入 0.6mL 乙醇,完全溶解后备用,三天内用完。
试剂二	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉体 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心使试剂落到底部,每支加 1.2mL 蒸馏水溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融,三天内用完。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、多功能氧化酶 (MFO)活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例进行提取。

【注】:若样本脂肪含量较高,或上面方法得到的上清液经过几次离心后还是较浑浊且经过预测定后得到 ΔA 小于 0.005,此时可考虑如下样本前处理步骤:取约 0.1g 组织,加入 1mL 的 90%乙醇冰浴匀浆,12000rpm,4℃离心 10min,弃上清液留沉淀;以上步骤可再重复 1 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液,混匀或再次冰浴匀浆,12000rpm,4℃离心 10min,取上清置冰上待测。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);12000rpm 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

③ 液体样本:直接检测;若浑浊,离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 405nm。

② 所有试剂解冻至室温(25℃),或可于水浴锅中孵育 15-25min。

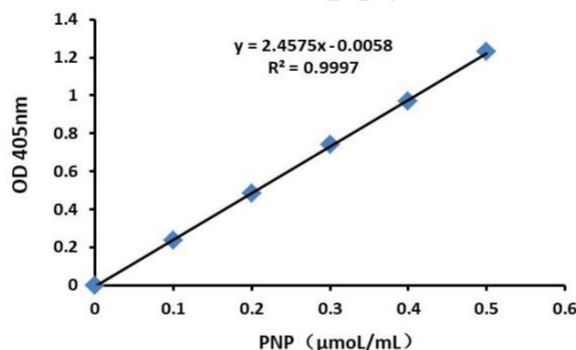
③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	50
试剂一	10
试剂二	120
试剂三	20
混匀，立即于 405nm 处读取吸光值 A1，37℃孵育 30min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】：若 ΔA 小于 0.005，可增加样本量 V1（如增至 100μL，则试剂二相应减少），或增加取样质量 W（如增至 0.2g），则改变后的样本量 V1 和样本质量 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 2.4575x - 0.0058$ ，PNP 摩尔浓度 (μmol/mL)，y 是 ΔA 。



- 2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟产生 1nmol 的对硝基苯酚（PNP）为 1 个酶活单位。

$$\text{MFO}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0058) \div 2.4575 \times 10^3 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 13.56 \times (\Delta A + 0.0058) \div W$$

- 3、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1nmol 的对硝基苯酚（PNP）为一个酶活单位。

$$\text{MFO}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0058) \div 2.4575 \times 10^3 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 13.56 \times (\Delta A + 0.0058) \div \text{Cpr}$$

- 4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟产生 1nmol 的对硝基苯酚（PNP）为一个酶活单位。

$$\text{MFO}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0058) \div 2.4575 \times 10^3 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 0.027 \times (\Delta A + 0.0058)$$

- 5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟产生 1nmol 的对硝基苯酚（PNP）为一个酶活单位。

$$\text{MFO}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0058) \div 2.4575 \times 10^3 \times V1] \div V1 \div T = 13.56 \times (\Delta A + 0.0058)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.05mL；

T---反应时间，30 min；

W---样本质量，g；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的蛋白含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（10μmol/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0，0.1，0.2，0.3，0.4，0.5 μmol/mL。
- 3 依据加样表操作：50μL 各个浓度的标准品+30μL 蒸馏水+120μL 试剂二，混匀 5min 后于 405nm 处读取吸光值 A，依据结果制作标准曲线。