

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

(货号: G1004F 分光法 48 样)

### 一、产品简介:

锰过氧化物酶 (EC1.11.1.13, Mnp) 是真菌分泌的一种糖基化的胞外蛋白, 含亚铁血红素的过氧化物酶, 主要存在于引起白腐的木腐菌和土壤枯草菌这两个担子真菌中, 属于木质素降解酶系, 能有效的降解木质素及废水和环境其他一些抗性物质, 如腐殖质酸和包括多环芳烃在内的多种有机污染物等。

锰过氧化物酶 (Mnp) 在  $Mn^{2+}$  存在的条件下, 将二甲氧基苯酚 (DMP) 氧化生成的产物在 470nm 处有特征吸收峰。通过检测该产物在 470nm 处的增加速率, 即可得到 Mnp 酶活性大小。

### 二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂×3 支	4°C 保存	临用前甩几下 EP 管使粉体落入底部, 再向每支 EP 管中加入 1.8mL 无水乙醇溶解 (可超声溶解); 取澄清液体使用。用不完的试剂 4°C 保存。
试剂三	粉剂×2 支	4°C 保存	用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.5mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂四	液体 $\mu$ L×1 支	4°C 保存	用前甩几下使液体落入底部, 取出 3 $\mu$ L 液体至新的 EP 管中, 再加 1.5mL 蒸馏水混匀备用。

### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、天平、低温离心机、研钵、水浴锅、冰和蒸馏水。

### 四、锰过氧化物酶 (Mnp) 活性测定:

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:

取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×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。

##### ② 细菌或培养细胞:

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 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照数量 ( $10^4$ ): 提取液体积 (mL) 为 500-1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 若是澄清液体, 直接检测, 若液体样本浑浊, 需 4°C×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

## 2、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 470nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂至常温状态（25℃）或于 25℃水浴条件下孵育 10-15min 左右。
- ③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	80
试剂一	580
试剂二	80
试剂三	40
试剂四	20
混匀，30℃条件下反应，10s 时读取 A1，10min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

## 五、结果计算：

### 1. 按照蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol 的 DMP 所需酶量为一个酶活力单位。

$$\text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 18.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 2. 按照样本质量计算：

酶活定义：每克样品每分钟氧化 1nmol 的 DMP 所需酶量为一个酶活力单位。

$$\text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 18.2 \times \Delta A \div W$$

### 3. 按照细胞数量计算：

酶活定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟氧化 1nmol 的 DMP 所需酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \\ &= 18.2 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

### 4. 按照液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟氧化 1nmol 的 DMP 所需酶量为一个酶活力单位。

$$\text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 18.2 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---DMP 被氧化的产物的摩尔消光系数：55000L/mol/cm； d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---反应中样本体积，0.08mL；

V2---反应总体积，8×10<sup>-4</sup>L；

W---样本质量，g；

T---反应时间，10min；

Cpr---样本蛋白浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。