

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

(货号: G1004W48 微板法 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 10mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂×1 支	4°C 保存	临用前甩几下 EP 管使粉体落入底部, 再向 EP 管中加入 1.5mL 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×1 支	4°C 保存	用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂四	液体 μ L×1 支	4°C 保存	用前甩几下使液体落入底部, 取出 2 μ L 液体至新的 EP 管中, 再加 1mL 蒸馏水混匀备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 470nm。

② 所有试剂至常温状态 (25°C) 或于 25°C 水浴条件下孵育 10-15min 左右。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	145
试剂二	20
试剂三	10
试剂四	5
混匀, 30°C条件下反应, 10s 时于 470nm 处读取 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。

$$\text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 36.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 36.4 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算:

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

$$\begin{aligned} \text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \\ &= 36.4 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

$$\text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 36.4 \times \Delta A$$

ϵ ---DMP 被氧化的产物的摩尔消光系数: 55000L/mol/cm;

d ---96 孔板光径, 0.5cm;

V ---加入提取液体积, 1mL;

$V1$ ---反应中样本体积, 0.02mL;

$V2$ ---反应总体积, 2×10^{-4} 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。