

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

分光光度法 50 管/48 样

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

自备实验用品及仪器：

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 75mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 11mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂四：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

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℃，10000g 离心 10min，取上清置于冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量（ 10^4 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℃，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。

测定操作:

- 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℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 放置 10min 以上。
- 3、样本测定表

试剂名称 (μL)	测定管
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: 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℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 放置 10min 以上, 测定时加入 100μL 样本和 900μL 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。

$$\text{MnP 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 413 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{MnP 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 413 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\begin{aligned} \text{MnP 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 413 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

$$\text{MnP 活性 (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 413 \times \Delta A$$

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; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 2min