

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 (μ L)	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 A_1 和 2min30s 后的吸光值 A_2 。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

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 100 μ L 样本和 900 μ L 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。

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。

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 10^4 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。

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

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。

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; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 1×10^{-3} L; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.1mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; T : 反应时间, 2min