

多功能氧化酶 (mixed function oxidase, MFO) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

多功能氧化酶又称混合功能氧化酶,可产生降解反应,可使原化学物质变为低毒的或无毒的物质从体内排出;还可产生激活反应,可使原化学物质转化为具有亲电子性质,导致毒性增强,成为致突变物或终致癌物。近年来对混合功能氧化酶系与外源性化学物质相互作用的深入研究,对于从分子生物学水平上进一步了解外源性化学物质的毒作用具有重要意义。

测定原理:

MFO 催化对硝基苯甲醚产生对硝基苯酚,在 400nm 下有特征吸光值。

自备用品:

分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰、蒸馏水、氯仿。

试剂组成和配制:

提取液:液体 100mL×1 瓶,4°C 保存;

试剂一:液体 30mL×1 瓶,4°C 避光保存;

试剂二:粉剂×3 管,-20°C 保存;临用前取一管加入 2mL 水溶解,现配现用。

试剂三:液体 30mL×1 瓶,4°C 保存;

试剂四:液体 80mL×1 瓶,4°C 保存。

粗酶液提取:

按照组织质量 (g): 提取液 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液),进行冰浴匀浆。12000g 4°C 离心 20min,取上清,置冰上待测。

测定步骤:

1、分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 400nm,蒸馏水调零。

2、在 10mL 管中依次加入如下试剂

| 试剂名称 (μL) | 测定 | 空白 |
|-------------------|-----|-----|
| 试剂一 | 500 | 500 |
| 试剂二 | 100 | 100 |
| 提取液 | 400 | 900 |
| 样本 | 500 | |
| 混匀, 37°C 水浴 30min | | |
| 试剂三 | 500 | 500 |

分别加入 2.5mL 氯仿,充分混匀萃取,静置 10min,取下层氯仿层 1.5mL 至新的管中。再加入试剂四 1.5mL,充分混匀萃取,取上层水相 1mL 于 1mL 玻璃比色皿中,400nm 下测定吸光值 A 测定与 A 空白, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。空白管只需测一管。

MFO 活性计算:

标准曲线: $y = 0.0238x + 0.0021$, $R^2 = 0.9997$; y, 吸光度; x, 标准品浓度, 单位 nmol/mL。

(1) 按样本质量计算

单位定义: 每 g 样本每分钟产生 1nmol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{MFO (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A - 0.0021) \div 0.0238 \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 7 \times (\Delta A - 0.0021) \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{MFO (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A - 0.0021) \div 0.0238 \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 7 \times (\Delta A - 0.0021) \div \text{Cpr}$$

V 总：最终萃取液体积，2.5 mL； V 样：反应中样品体积，500 μ L； T：反应时间，30min；

W：样品质量，g； Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL。