

# 锰过氧化物酶 (Mnp) 活性检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC1625

规格：100T/96S

**产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 120mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 3mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 5mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 200μL×1 支	2-8°C保存

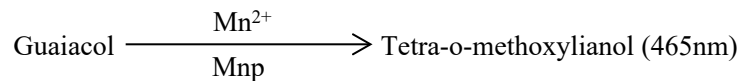
溶液配制：

试剂四：临用前根据实验所需量按照试剂四 (μL)：蒸馏水 (μL) =1:49 的比例配制，现用现配。

**产品说明：**

锰过氧化物酶 (Mnp) (EC1.11.1.13) 是一种普遍存在于细菌和真菌中的微生物木质素分解酶，在微生物木质素分解系统中起着关键作用，它可以有效的降解木质素以及废水和土壤中比较难降解的化合物，在生物制浆、生物漂白和污染物的生物降解等工业领域具有广泛应用。

锰过氧化物酶在  $Mn^{2+}$  环境下，可将愈创木酚氧化为四邻甲氧基连酚，四邻甲氧基连酚在 465nm 处有吸收峰，通过检测 465nm 处吸光值的变化，可测定锰过氧化物酶的活性。



**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、超声波细胞破碎仪、可调式移液器、研钵/匀浆器、微量玻璃比色皿/96 孔板、震荡仪、冰和蒸馏水。

**操作步骤：**

**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

1、组织：按照样本质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为 1:5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）加入试剂一，冰浴匀浆；10000g 4°C离心 10min，取上清置冰上待测。

2、细菌或细胞样本：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清，按照细菌或细胞数量 ( $10^4$  个)：试剂一体积 (mL) 为 500-1000:1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一）加入试剂一，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 30%或 300W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min），10000g 4°C离心 10min，取上清置冰上待测。

3、液体样本：直接检测。若溶液浑浊则离心后取上清进行测定。

**二、测定步骤**

1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 465nm，可见分光光度计需用蒸馏水调零。

2、测定前根据实验用量取出部分试剂一、试剂二、试剂三和试剂四置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其他动物）预热 10min 以上。

3、加样表（在微量玻璃比色皿/96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管
样本（ $\mu\text{L}$ ）	20
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	100
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）	20
试剂三（ $\mu\text{L}$ ）	40
试剂四（ $\mu\text{L}$ ）	20

将上述试剂分别加入微量玻璃比色皿/96 孔板后迅速吹打混匀，记录第 30s 的吸光值 A1 以及 10min30s 时的吸光值 A2，计算  $\Delta A = A2 - A1$ 。若一次性测定样本过多，可根据使用量将试剂一、二、三、四按 5:1:2:1 比例配成工作液后进行预热，测定时按照 20 $\mu\text{L}$  样本+180 $\mu\text{L}$  工作液加入微量玻璃比色皿/96 孔板进行测定。

### 三、Mnp 活力的计算

#### A. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

##### 1.按样本蛋白质浓度计算

酶活定义：pH4.5 条件下，每 mg 组织蛋白每分钟氧化 1nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Mnp 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 82.64 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

##### 2.按样本质量计算

酶活定义：pH4.5 条件下，每 mg 组织每分钟氧化 1nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Mnp 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 82.64 \times \Delta A \div W$$

##### 3.按细菌/细胞数量计算

酶活定义：pH4.5 条件下，每  $10^4$  细菌/细胞每分钟氧化 1nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Mnp 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 82.64 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

##### 4.按照样本体积计算

酶活定义：pH4.5 条件下，每 mL 血清或液体样本每分钟消耗 1nmol 底物的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Mnp 活性 (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 82.64 \times \Delta A$$

$\epsilon$ : 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, 0.0002L;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.02mL,  $V_{\text{样总}}$ : 提取液体积, 1mL;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 10 min;  $10^9$ : 单位换算系数, 1mol=10<sup>9</sup>nmol。

#### B. 用 96 孔 UV 板测定的计算公式如下：

##### 1.按样本蛋白质浓度计算

酶活定义：pH4.5 条件下，每 mg 组织蛋白每分钟氧化 1nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Mnp 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 137.74 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

##### 2.按样本质量计算

酶活定义：pH4.5 条件下，每 g 组织每分钟氧化 1nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Mnp 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 137.74 \times \Delta A \div W$$

### 3. 按细菌/细胞数量计算

酶活定义：pH4.5 条件下，每 10<sup>4</sup> 细菌/细胞每分钟氧化 1nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Mnp 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 137.74 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

### 4. 按照样本体积计算

酶活定义：pH4.5 条件下，每 mL 血清或液体样本每分钟消耗 1nmol 底物的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Mnp 活性 (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 137.74 \times \Delta A$$

$\epsilon$ : 愈创木酚摩尔消光系数: 12100 L/mol/cm;  $d$ : 比色皿光径, 0.6cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应总体积, 0.0002L;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.02mL,  $V_{\text{样总}}$ : 提取液体积, 1mL;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量, g;  $T$ : 反应时间, 10 min;  $10^9$ : 单位换算系数, 1mol=10<sup>9</sup>nmol。

### 注意事项:

当 A1 大于 1.5 或者  $\Delta A$  大于 0.6 (酶标仪  $\Delta A$  大于 0.4) 时, 建议将样本用试剂一稀释后测定; 当  $\Delta A$  过小时, 可以适当加大样本量后重新进行测定。注意同步修改计算公式。

### 实验实例:

取 0.1002g 杏鲍菇加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。10000g 4°C 离心 10min, 取上清置冰上, 之后按照测定步骤操作, 测得计算 A1=0.055, A2=0.064,  $\Delta A=A2-A1=0.009$ , 按样本质量计算酶活得:

$$\text{Mnp 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 12.37 \text{U/g 质量。}$$

### 参考文献:

[1] Chowdhary P, Shukla G, Raj G, et al. Microbial manganese peroxidase: a ligninolytic enzyme and its ample opportunities in research[J]. SN Applied Sciences, 2019, 1(1):45.

[2] Rogalski J, Lundell T, Leonowicz A, et al. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of Trametes versicolor depending on culture conditions[J]. Polish Society of Microbiologists, 1991, 40(3-4):221-234.

### 相关系列产品:

- BC1630/BC1635 漆酶活性检测试剂盒
- BC0200/BC0205 过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒
- BC0090/BC0095 过氧化物酶 (POD) 活性检测试剂盒
- BC1610/BC1615 木质素过氧化物酶 (Lip) 活性检测试剂盒

