

锰过氧化物酶（Mnp）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHC5-M48	锰过氧化物酶(Mnp)试剂盒	48T	微量法
PMHC5-M96		96T	

一、测定意义：

锰过氧化物酶（Mnp）是一种普遍存在于细菌或真菌的微生物木质素分解酶，在微生物木质素分解酶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。

二、测定原理：

锰过氧化物酶在 Mn^{2+} 存在的条件下，催化愈创木酚氧化为四邻甲氧基连酚的能力，这一反应在 465nm 处有特征吸收峰，因此可以通过可见分光光度法来测定酶活性。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 55mL×1 瓶	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一	液体 6mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	液体 1.5mL×1 瓶	液体 2.5mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂三	液体 2.5mL×1 瓶	液体 5mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂四	液体 1.5mL×1 瓶	液体 2.5mL×1 瓶	4℃ 保存
临用前将试剂一、试剂二、试剂三和试剂四按 5:1:2:1 比例混匀配制成工作液。			

四、操作步骤：

样本前处理

1、组织：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、细菌/细胞：按照细胞数量（10⁴ 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 200W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 5min）；然后 10000g，4℃ 离心 10min，取上清置于冰上待测。

3、血清（浆）等液体样本：直接测定。若有浑浊请离心后取上清待测。

测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 465nm，蒸馏水调零。

2、测定前将配制好的工作液于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他动物）预热 10min。

3、在微量比色皿或 96 孔板中依次加入 20 μ 样本和 180 μ 工作液，吹打混匀后立即于波长 465nm 处读取第 30s 和 10min30s 的吸光值，分别记为 A1 和 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

五、Mnp 活力的计算：

1、按血清（浆）等液体体积计算：

酶活定义：在 PH4.5 条件下，每毫升血清或液体样本每分钟消耗 1mol 底物的酶量为一个酶活单位。

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

2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：在 PH4.5 条件下，每毫克组织蛋白每分钟氧化 1mol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活单位。

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

3、按样本质量计算：

酶活定义：在 PH4.5 条件下，每克组织每分钟氧化 1mol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活单位。

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

4、按细胞/细菌数量计算：

酶活定义：在 PH4.5 条件下，每 10⁴ 细菌/细胞每分钟氧化 1mol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活单位。

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

T: 反应时间, 10min;

V 反总: 反应液总体积, 0.0002L;

V 样: 加入样本体积。0.02mL;

V 样总: 提取液体积, 1mL;

Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g;

ϵ : 愈创木酚摩尔消光系数: 12100L/mol/cm;

d: 比色皿光径;

10⁹: 换算系数, 1mol=10⁹nmol.

六、注意事项：

如果 A1 大于 1.5 或者 ΔA 大于 0.6（酶标仪 ΔA 大于 0.4）时，建议将样本稀释后测定；如果 ΔA 过小时，可以适当加大样本量后重新测定，注意同步修改公式。