

Manganese Peroxidase Activity Assay Kit

锰过氧化物酶 (Mnp) 试剂盒说明书

货号:BN72372 | 方法: 微板法 | 规格: 96 样

一、产品简介:

锰过氧化物酶 (EC1.11.1.13, Mnp) 是真菌分泌的一种糖基化的胞外蛋白, 含亚铁血红素的过氧化物酶, 主要存在于引起白腐的木腐菌和土壤枯草菌这两个担子真菌中, 属于木质素降解酶系, 能有效的降解木质素及废水和环境其他一些抗性物质, 如腐殖质酸和包括多环芳烃在内的多种有机污染物等。

锰过氧化物酶 (Mnp) 在 Mn^{2+} 存在的条件下, 将二甲氧基苯酚 (DMP) 氧化生成的产物在 470nm 处有特征吸收峰。通过检测该产物在 470nm 处的增加速率, 即可得到 Mnp 酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×2 支	4°C保存	临用前甩几下 EP 管使粉体落入底部, 再向每支 EP 管中加入 1.5mL 无水乙醇溶解 (可超声溶解); 取澄清液体使用。用不完的试剂 4°C 保存。
试剂三	粉剂×1 支	4°C保存	用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.5mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂四	液体 μ L×1 支	4°C保存	用前甩几下使液体落入底部, 取出 2 μ L 液体至新的 EP 管中, 再加 1mL 蒸馏水混匀备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、天平、低温离心机、研钵、水浴锅、冰和蒸馏水。

四、锰过氧化物酶 (Mnp) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。
4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌或培养细胞:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次);
4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照数量 (10^4): 提取液体积 (mL) 为 500-1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 若是澄清液体, 直接检测, 若液体样本浑浊, 需 4°C×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 470nm。
- ② 所有试剂至常温状态（25℃）或于 25℃水浴条件下孵育 10-15min 左右。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	20
试剂一	145
试剂二	20
试剂三	10
试剂四	5
混匀，30℃条件下反应，10s 时于 470nm 处读取 A1，10min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1. 按照蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol 的 DMP 所需酶量为一个酶活力单位。

$$\text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 36.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算：

酶活定义：每克样品每分钟氧化 1nmol 的 DMP 所需酶量为一个酶活力单位。

$$\text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 36.4 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1nmol 的 DMP 所需酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \\ &= 36.4 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟氧化 1nmol 的 DMP 所需酶量为一个酶活力单位。

$$\text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 36.4 \times \Delta A$$

ϵ ---DMP 被氧化的产物的摩尔消光系数：55000L/mol/cm； d ---96 孔板光径，0.5cm；
 V ---加入提取液体积，1mL； $V1$ ---反应中样本体积，0.02mL；
 $V2$ ---反应总体积，2×10⁻⁴ L； W ---样本质量，g； T ---反应时间，10min
 Cpr ---样本蛋白浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。