

锰过氧化物酶（Manganese peroxidase, Mnp）试剂盒说明书

（分光法 48 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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	使用前甩几下使粉剂落入底部，再加 5mL 无水乙醇溶解备用。
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	使用前甩几下使粉剂落入底部，再加 3mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂四	液体 μ L×1 支	4℃保存	使用前甩几下使液体落入底部，取出 3 μ L 液体至新的 EP 管中，再加 1.5mL 蒸馏水混匀备用。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、天平、低温离心机、研钵、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℃×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℃×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℃×12000rpm，离心 10min，取上清液检测。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 470nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂至常温状态（25℃）。

③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	80
试剂一	580
试剂二	80
试剂三	40
试剂四	20
混匀，30°C条件下反应，10s 时读取 A1，10min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】若 ΔA 在零附近徘徊，可增加样本量（如增至 40μL，则试剂一相应减少），或延长反应时间 T 至 15min 或更长，则改变后的样本 V1 和反应时间 T 需代入公司重新计算。

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。

$$\text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 18.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 18.2 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\begin{aligned} \text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \\ &= 18.2 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

$$\text{MnP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 18.2 \times \Delta A$$

ϵ ---DMP 被氧化的产物的摩尔消光系数：55000L/mol/cm； d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---反应中样本体积，0.08mL；

V2---反应总体积，8×10⁻⁴L；

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。