

多功能氧化酶 (MFO)活性测定说明书

(货号: BP10187F 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

多功能氧化酶 (MFO)是生物体内重要的一种解毒酶,可使昆虫适应植物的变化;减弱或免受植物诱导抗性产生的有毒次生物质对昆虫的毒害。

多功能氧化酶 (MFO) 催化对硝基苯甲醚产生对硝基苯酚,该产物在 405nm 下有特征吸收峰,通过检测该物质在 405nm 处的光吸收增加速率,进而得出 MFO 活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	提取液 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 2 支	4℃避光保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 分别加入 1.4mL 乙醇,完全溶解后备用,现配现用。
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉体 2 瓶	-20℃保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 每瓶加 2.7mL 蒸馏水溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融,三天内用完。
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲,则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验,熟悉操作流程,根据预实验结果确定或调整样本浓度,以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织,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/细胞样本:

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 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);12000rpm 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤：

① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

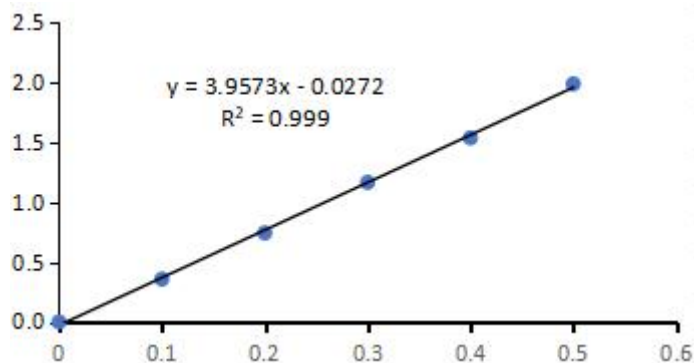
③ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	250
试剂一	50
试剂二	300
试剂三	100
混匀，立即于 405nm 处读取吸光值 A1，37℃ 孵育 30min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：若 ΔA 小于 0.005，可增加样本量 V1（如增至 300μL，则试剂二相应减少），或增加取样质量 W（如增至 0.2g），则改变后的样本量 V1 和样本质量 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 3.9573x - 0.0272$ ，PNP 摩尔浓度 (μmol/mL)，y 是 ΔA 。



2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟产生 1nmol 的对硝基苯酚 (PNP) 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol/min/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0272) \div 3.9573 \times 10^3 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 8.42 \times (\Delta A + 0.0272) \div W \end{aligned}$$

3、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1nmol 的对硝基苯酚 (PNP) 为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0272) \div 3.9573 \times 10^3 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 8.42 \times (\Delta A + 0.0272) \div Cpr \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟产生 1nmol 的对硝基苯酚 (PNP) 为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0272) \div 3.9573 \times 10^3 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.017 \times (\Delta A + 0.0272) \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟产生 1nmol 的对硝基苯酚 (PNP) 为一个酶活单位。

$$\text{MFO}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0272) \div 3.9573 \times 10^3 \times V1] \div V1 \div T = 8.42 \times (\Delta A + 0.0272)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.25mL；

T---反应时间，30 min；

W---样本质量，g；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的蛋白含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解，标准品母液浓度为 10 μ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.1，0.2，0.3，0.4，0.5 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 50uL，加入 950uL 蒸馏水，混匀得到 0.5 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	250	
蒸馏水		250
试剂一	50	50
试剂二	300	300
试剂三	100	100
于 405nm 下读取各管吸光值， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		