

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

（货号：BP10465W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	二 A：粉剂 1 支 二 B：空瓶 1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前甩几下 EP 管（二 A）使粉体落入底部，再向 EP 管中加入 0.5mL 无水乙醇溶解，全部转移至空瓶 B 中； 2. 再向 EP 管中加入 0.5mL 无水乙醇涮洗后全部转移至 B 瓶中（可分别再用 0.5mL 无水乙醇涮洗 EP 管 2 次），最后再加 0.5mL 无水乙醇混匀后做为试剂二待用（总体积为 2.5mL）（可超声溶解），取澄清液体使用； 3. 用不完的试剂 4℃保存。
试剂三	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.5mL 蒸馏水充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 取出 2μL 液体至新的 EP 管中，再加 1mL 蒸馏水混匀备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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：

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（10⁴）：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、检测步骤：

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℃）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（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】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。

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

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。

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

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。

MnP 活性(nmol/min/10⁴ cell)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$]÷(细胞数量×V1÷V)÷T
=36.4× $\Delta A \div$ 细胞数量

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。

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

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。