

# 锰过氧化物酶 (Mnp) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：AC10343

规格：50T/48S

**产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 80mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 6mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 11mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 200μL×1 支	2-8°C保存

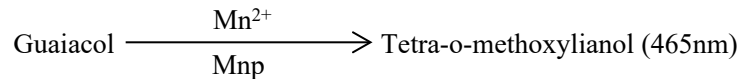
溶液配制：

试剂四：临用前根据实验所需量按照试剂四（μL）：蒸馏水（μL）=1:49 的比例配制，现用现配。

**产品说明：**

锰过氧化物酶 (Mnp) (EC1.11.1.13) 是一种普遍存在于细菌和真菌中的微生物木质素分解酶，在微生物木质素分解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。

锰过氧化物酶在  $Mn^{2+}$  环境下，可将愈创木酚氧化为四邻甲氧基连酚，四邻甲氧基连酚在 465nm 处有吸收峰，通过检测 465nm 处吸光值的变化，可测定锰过氧化物酶的活性。



**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、超声波细胞破碎仪、研钵/匀浆器、1mL 玻璃比色皿、震荡仪、冰和蒸馏水。

**操作步骤：**

**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

1、组织：按照样本质量（g）：试剂一体积（mL）为 1:5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）加入试剂一，冰浴匀浆；10000g 4°C离心 10min，取上清置冰上待测。

2、细菌或细胞样本：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清，按照细菌或细胞数量（ $10^4$  个）：试剂一体积（mL）为 500-1000:1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一）加入试剂一，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 30%或 300W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min），10000g 4°C离心 10min，取上清置冰上待测。

3、液体样本：直接检测。若溶液浑浊则离心后取上清进行测定。

**二、测定步骤**

1、可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 465nm，蒸馏水调零。

2、测定前根据实验用量取出部分试剂一、试剂二、试剂三和试剂四置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其他动物）预热 10min 以上。

3、加样表（在 1mL 玻璃比色皿中依次加入下列试剂）：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管
样本（ $\mu\text{L}$ ）	100
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	500
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）	100
试剂三（ $\mu\text{L}$ ）	200
试剂四（ $\mu\text{L}$ ）	100

将上述试剂分别加入 1mL 玻璃比色皿后迅速吹打混匀，记录第 30s 的吸光值 A1 以及 10min30s 时的吸光值 A2，计算  $\Delta A = A2 - A1$ 。若一次性测定样本过多，可根据使用量将试剂一、二、三、四按 5:1:2:1 比例配成工作液后进行预热，测定时按照 100 $\mu\text{L}$  样本+900 $\mu\text{L}$  工作液加入 1mL 玻璃比色皿进行测定。

### 三、Mnp 活力的计算

#### 1.按样本蛋白质浓度计算

酶活定义：pH4.5 条件下，每 mg 组织蛋白每分钟氧化 1nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Mnp 活性 (U / mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 82.64 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### 2.按样本质量计算

酶活定义：pH4.5 条件下，每 g 组织每分钟氧化 1nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Mnp 活性 (U / g 质量)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 82.64 \times \Delta A \div W$$

#### 3.按细菌/细胞数量计算

酶活定义：pH4.5 条件下，每  $10^4$  细菌/细胞每分钟氧化 1nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Mnp 活性 (U / } 10^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 82.64 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

#### 4、按照样本体积计算

酶活定义：pH4.5 条件下，每 mL 血清或液体样本每分钟消耗 1nmol 底物的酶量为一个酶活单位。

$$\text{Mnp 活性 (U / mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 82.64 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ：愈创木酚摩尔消光系数：12100 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应总体积，0.001L；V 样：加入样本体积，0.1mL，V 样总：提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，10 min； $10^9$ ：单位换算系数，1mol=10<sup>9</sup>nmol。

### 注意事项：

当 A1 大于 1.2 或者  $\Delta A$  大于 0.5 时，建议将样本用试剂一稀释后测定；当  $\Delta A$  过小时，可以适当加大样本量后重新进行测定。注意同步修改计算公式。

### 实验实例：

取 0.1002g 杏鲍菇加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。10000g 4°C 离心 10min，取上清置冰上，之后按照测定步骤操作，测得计算 A1=0.011，A2=0.03， $\Delta A = A2 - A1 = 0.019$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{Mnp 活性 (U / g 质量)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 15.67 \text{U / g 质量。}$$

### 参考文献：

[1] Chowdhary P, Shukla G, Raj G, et al. Microbial manganese peroxidase: a ligninolytic enzyme and its ample opportunities in research[J]. SN Applied Sciences, 2019, 1(1):45.

[2] Rogalski J, Lundell T, Leonowicz A, et al. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions[J]. Polish Society of Microbiologists, 1991, 40(3-4):221-234.