CheKine™ 锰过氧化物酶（MnP）活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1151　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动植物组织、细胞或细菌、血清（浆）或其他液体
	保质期：4℃避光保存 6 个月

01 背景与原理

锰过氧化物酶（Manganese Peroxidase, MnP）（EC 1.11.1.13）是一种含亚铁血红素的过氧化物酶，主要存在于担子菌中，属于木质素降解酶系。该酶能有效地降解木质素及废水和土壤中比较难降解的氯化物、叠氮化合物、DTT、多环芳烃等。

本试剂盒检测原理是 MnP 在 Mn^{2+} 存在的条件下，将愈创木酚氧化为四邻甲氧基连酚，该产物在 465 nm 有特征吸收峰。反应体系中生成的产物量与样品中 MnP 的活性成正比关系。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	70 mL	70×2 mL	4℃
Reagent Ⅰ	1.2 mL	2.4 mL	4℃
Reagent Ⅱ	2.5 mL	5 mL	4℃，避光保存
Reagent Ⅲ	1.2 mL	2.4 mL	4℃

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 465 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	PBS	样本稀释用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温水浴锅、制冰机、离心机、恒温箱、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存
Reagent Ⅲ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。

- **动植物组织**：称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，10000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- **细胞或细菌**：收集 5×10^6 个细胞或细菌，用预冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL Extraction Buffer 进行冰浴超声破碎。超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），4℃，10000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。
- **血清（浆）**：直接测定。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 465 nm。
2. **工作液的配制**：临用前配制，若一次性测定样本过多，可根据使用量将 Extraction Buffer, Reagent Ⅰ, Reagent Ⅱ和 Reagent Ⅲ按 5:1:2:1 的比例混合，现用现配，测定时按照 20 μL 样本+180 μL 工作液检测。检测前，工作液置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）预热 10 min 以上。

3. **检测体系配制**：在 96 孔板中按照如下方式操作：

试剂	测定孔（μL）
样本上清	20
Extraction Buffer	100
Reagent Ⅰ	20
Reagent Ⅱ	40
Reagent Ⅲ	20

4. **吸光度检测**：迅速混匀，立即测定 465 nm 处吸光值。记录第 30 s 和 2 min 30 s 时吸光值，分别记录为 A_1 和 A_2。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A=A_2-A_1$。

2. 样本 MnP 活性计算

- 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每 min 氧化 1 nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$MnP\ (U/mg\ prot)=[\Delta A\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times10^9]\div(Cpr\times V_{样})\div T$**$=826\times\Delta A\div Cpr$**

- 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每 min 氧化 1 nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$MnP\ (U/g)=[\Delta A\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times10^9]\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T$**$=826\times\Delta A\div W$**

- 按细胞或细菌密度计算

单位的定义：每 10^4 细菌或细胞在反应体系中每 min 氧化 1 nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$MnP\ (U/10^4)=[\Delta A\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times10^9]\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\div T$**$=826\times\Delta A\div N$**

- 按样本体积计算

单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每 min 氧化 1 nmol 愈创木酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$MnP\ (U/mL)=[\Delta A\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times10^9]\div V_{样}\div T$**$=826\times\Delta A$**

ε：愈创木酚摩尔消光系数：12100 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；$V_{反总}$：反应体系总体积，2×10^{-4} L；$V_{样}$：加入反应体系中样本体积，0.02 mL；$V_{样总}$：加入 Extraction Buffer 体积，1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，2 mi；N：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=500）

07 结果展示

示例-1：取 0.128 g 小鼠肝脏，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A=A_2-A_1=0.098-0.096=0.002$。按样本质量计算得：MnP (U/g)=826×ΔA÷W=12.906 U/g。

示例-1：取 0.112 g 小鼠肾脏，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A=A_2-A_1=0.125-0.118=0.007$。按样本质量计算得：MnP (U/g)=826×ΔA÷W=78.667 U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔA 过高或者过低怎么办?**

当ΔA 大于 0.6 时，建议将样本用 Extraction Buffer 稀释后测定；当ΔA 小于 0.002 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。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1015	CheKine™ α-葡萄糖苷酶活性检测试剂盒（微量法）
KTB1121	CheKine™ 丙酮酸（PA）含量检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 锰过氧化物酶（Mnp）活性检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1151）

