

多功能氧化酶 (MFO)活性测定说明书

(货号: ADS-W-YHKY011 微板法 96 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	提取液 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 2 支	4℃保存	每支使用前甩几下使试剂落入底部, 分别加入 0.6mL 乙醇, 完全溶解后备用, 现配现用。
试剂二	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉体 2 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心使试剂落到底部, 每支加 1.2mL 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℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、多功能氧化酶 (MFO)活性检测:

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:

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 (10⁴): 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、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃) 。

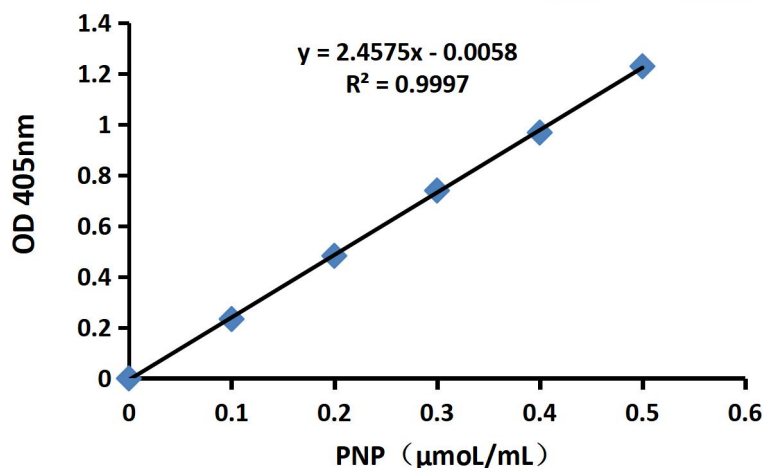
③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	50
试剂一	10
试剂二	120
试剂三	20
混匀，立即于 405nm 处读取吸光值 A1， 37°C 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 80μL，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： $y = 2.4575x - 0.0058$ ， 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。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol/min/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0058) \div 2.4575 \times 10^3 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 13.56 \times (\Delta A + 0.0058) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0058) \div 2.4575 \times 10^3 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 13.56 \times (\Delta A + 0.0058) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0058) \div 2.4575 \times 10^3 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.027 \times (\Delta A + 0.0058) \end{aligned}$$

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。

$$\text{MFO}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0058) \div 2.4575 \times 10^3 \times V1] \div V1 \div T = 13.56 \times (\Delta A + 0.0058)$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.05mL；

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 制备标准品母液 ($10\mu\text{mol/mL}$)：向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。