

多功能氧化酶 (MFO)活性测定说明书

(货号: ADS-W-YHKY011 微板法 96 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 100mL×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 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	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 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℃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)、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:

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 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℃）。

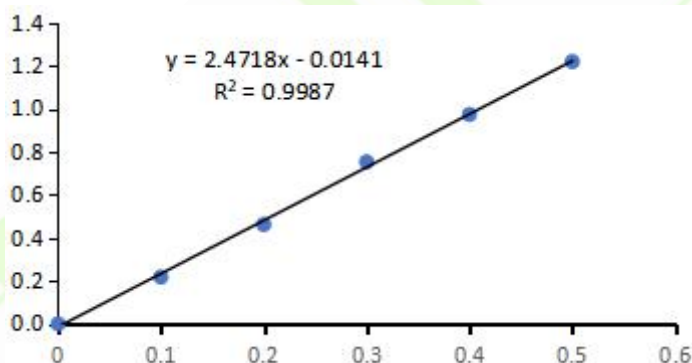
③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (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℃ 孵育 30min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：若 ΔA 小于 0.005，可增加样本量 V_1 （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 V_1 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： $y = 2.4718x - 0.0141$ ，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。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0141) \div 2.4718 \times 10^3 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 13.49 \times (\Delta A + 0.0141) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0141) \div 2.4718 \times 10^3 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 13.49 \times (\Delta A + 0.0141) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0141) \div 2.4718 \times 10^3 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ &= 0.027 \times (\Delta A + 0.0141) \end{aligned}$$

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。

$$\text{MFO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0141) \div 2.4718 \times 10^3 \times V_1] \div V_1 \div T = 13.49 \times (\Delta A + 0.0141)$$

V ---加入提取液体积，1 mL； V_1 ---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 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	50	
蒸馏水		50
试剂一	10	10
试剂二	120	120
试剂三	20	20
混匀，于 405nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{测定} - A_{0 浓度管}$ 。		