

多功能氧化酶 (MFO)活性测定说明书

(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 mg×2 支 | 4℃保存 | 每支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 6mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂三 | 粉体 mg×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 mg×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：

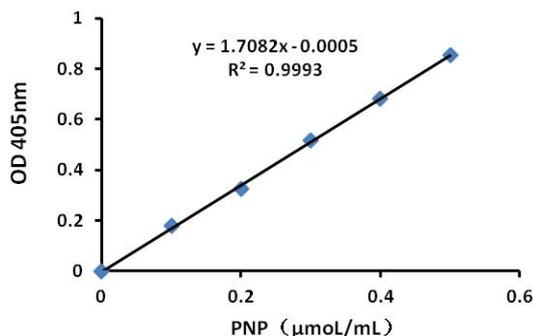
| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|-----------|-----|
| 样本 | 50 |
| 试剂一 | 10 |

| | |
|---|----|
| 试剂二 | 60 |
| 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 80 μ L，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： $y=1.7082x-0.0005$ ， PNP 摩尔浓度（ μ mol/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。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0005) \div 1.7082 \times 10^3 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 19.5 \times (\Delta A + 0.0005) \div W \end{aligned}$$

- 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。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0005) \div 1.7082 \times 10^3 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 19.5 \times (\Delta A + 0.0005) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

- 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。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0005) \div 1.7082 \times 10^3 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.039 \times (\Delta A + 0.0005) \end{aligned}$$

- 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。

$$\text{MFO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0005) \div 1.7082 \times 10^3 \times V1] \div V1 \div T = 19.5 \times (\Delta A + 0.0005)$$

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 μ 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 μ 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。