

## 多功能氧化酶 (MFO)活性测定说明书

(分光法 48 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 60mL×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 1.4mL 乙醇，完全溶解后备用，现配现用。
试剂二	液体 15mL×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 2.7mL 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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、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 (10<sup>4</sup>)：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 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

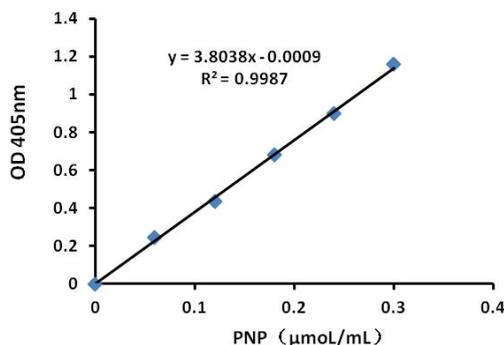
试剂名称 (μL)	测定管
样本	250

试剂一	50
试剂二	300
试剂三	100
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 $\Delta A$  小于 0.005，可增加样本量 V1（如增至 300 $\mu$ 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： $y = 3.8038x - 0.0009$ ，PNP 摩尔浓度（ $\mu$ mol/mL），y 是 $\Delta A$ 。



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。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0009) \div 3.8038 \times 10^3 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 8.8 \times (\Delta A + 0.0009) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0009) \div 3.8038 \times 10^3 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 8.8 \times (\Delta A + 0.0009) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{MFO}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0009) \div 3.8038 \times 10^3 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.018 \times (\Delta A + 0.0009) \end{aligned}$$

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。

$$\text{MFO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0009) \div 3.8038 \times 10^3 \times V1] \div V1 \div T = 8.8 \times (\Delta A + 0.0009)$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.25mL；

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 $\mu$ 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：0，0.06，0.12，0.18，0.24，0.3  $\mu$ 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。