

多功能氧化酶(MFO)/单加氧酶 检测试剂盒（免氯仿/微量法）

货 号：PMK1067BKM
规 格：48T/24S 96T/48S 2×96T/96S
检测方法：比色法
储存条件：-20℃避光保存 6 个月

建议正式实验前，选取 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验，如果样本吸光值不在检测范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

一、产品简介

研究背景：多功能氧化酶系又称混合功能氧化酶（Mixed Functional Oxidase）或单加氧酶，是一类由细胞色素 P450、细胞色素 b5、NADPH-细胞色素 b5 还原酶、NADPH-细胞色素 c 还原酶及磷脂等组成的氧化酶系。MFO 可产生降解反应，可使原化学物质变为低毒的或无毒的物质从体内排出；还可产生激活反应，可使原化学物质转化为具有亲电子性质，导致毒性增强，成为致突变物或终致癌物。近年来对混合功能氧化酶系与外源性化学物质相互作用的深入研究，对于从分子生物学水平上进一步了解外源性化学物质的毒作用具有重要意义。

检测原理：本试剂盒提供了一种简单易用的比色法，用于分析各种生物样品中 MFO 活性。其原理是多功能氧化酶能够催化对硝基苯甲醚生成对-硝基苯酚，产物在 405nm 处具有特征吸收峰，通过测定吸光值升高速率即可表征多功能氧化酶的活性。

检测意义：评估代谢能力、预判毒性走向、解析毒理机制、预警致癌风险、支撑安评研究。

适用样本：动植物组织、细胞。

二、产品内容

试剂盒组分	规格			储存条件
	48T	96T	2×96T	
提取液	50mL	100mL	100mL×2	4℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	粉剂×4 瓶	4℃避光保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	粉剂×4 瓶	-20 避光℃保存
试剂三	12mL	24mL	48mL	4℃保存
试剂四	12mL	24mL	48mL	4℃保存
标准品	1mL	1mL	1mL	4℃保存

三、需自备的仪器和用品

酶标仪或可见光分光光度计（能测 405nm 处的吸光度）及水浴锅、96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头、离心机、制冰机、去离子水、匀浆器。（如果是组织样本）

四、试剂准备

提取液：即用型；4℃保存。

试剂一：临用前每瓶加入 12mL 去离子水，充分振荡或涡旋溶解备用；用不完的试剂可 4℃避光保存一周或分装-20℃避光长期保存，避免反复冻融。

试剂二：临用前每瓶加入 2.5mL 去离子水，充分溶解备用；用不完的试剂分装-20℃避光保存，避免反复冻融。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

标准品：标准品为 5mM ($\mu\text{mol/mL}$) 的对硝基苯酚溶液，使用前，平衡到室温；4℃保存。

标准曲线设置：按下表所示，用去离子水将 5 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品稀释为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.13 nmol/mL 标准溶液 的标准溶液。

	标准品体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 (nmol/mL)
标准品 1	40 μL of 5 $\mu\text{mol/mL}$	960	200
标准品 2	500 μL of 标准品 1 (200nmol/mL)	500	100
标准品 3	500 μL of 标准品 2 (100nmol/mL)	500	50
标准品 4	500 μL of 标准品 3 (50nmol/mL)	500	25
标准品 5	500 μL of 标准品 4 (25nmol/mL)	500	12.5
标准品 6	500 μL of 标准品 5 (12.5nmol/mL)	500	6.25
标准品 7	500 μL of 标准品 6 (6.25nmol/mL)	500	3.13

注意：每次实验，请使用新配制的标准品。

五、样本制备

动植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液冰浴匀浆，12,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

细胞：收集 500 万细胞到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），12,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

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。处理好的样本需当天检测，禁止冻融。如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

六、实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 405nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 样本测定：在 EP 管中依次加入下列试剂

	标准 (μL)	空白 (μL)	测定 (μL)	对照 (μL)
试剂一	200	200	200	0
试剂二	40	40	40	40
去离子水	160	360	160	360
标准品	200	0	0	0
样本	0	0	200	200
迅速混匀，放入 37℃准确水浴 30min				
试剂三	200	200	200	200

迅速混匀，12,000g，4℃离心 10min，取全部上清液				
试剂四	200	200	200	200

充分混匀，室温静置 2min 后，405nm 处测定吸光值 A，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。每个测定管需设一个对照，空白和标准曲线只需要测一次。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 ΔA 测小于 0.005 可适当加大样本量。如果 ΔA 测大于 0.4，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。

七、结果计算

1. 标准曲线的绘制：

以标准品浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标准}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入方程计算出 y 值（nmol/mL）。

2. 样本 MFO 活性计算

（1）按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位 U。

$$\text{MFO 活性(U/g 质量)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.1 \times y \div W$$

（2）按液体样本体积计算

单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位 U。

$$\text{MFO 活性(U/mL)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div V_{\text{样}} \div T = 0.1 \times y$$

（3）按细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细胞在反应体系中每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位 U。

$$\text{MFO 活性(U/10}^4 \text{ cell)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.0002 \times y$$

（4）按蛋白浓度计算

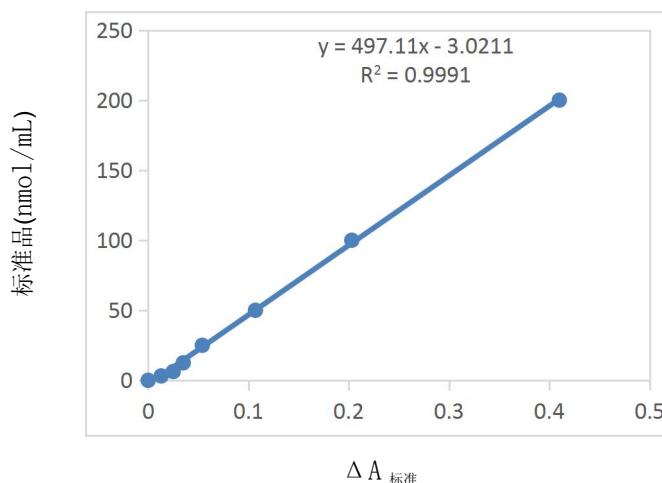
单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位 U。

$$\text{MFO 活性 (U/mg prot)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 0.1 \times y \div Cpr$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.6mL；W：样本质量，g； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.2mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，30min；500：细胞总数，500 万；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

结果展示

典型标准曲线



附录：常见问题与解决方案（FAQ）

问题	解决措施
计算时如果选择合适的计算公式？	动物组织及细胞微生物等，可以用质量或者细胞数量计算，也可以建议测蛋白浓度
	植物可建议用质量计算，也可以建议测蛋白
	血液或是其他液态样品，可建议用体积计算
	如客户要购买蛋白含量测定试剂盒，除了说明书强调用考马斯亮蓝法的，通常建议 BCA 法。动植物组织因为蛋白含量高，在 10mg/ml 左右，如果用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度的话通常需要用 PBS 缓冲液等稀释液进行稀释。
测定时如何进行调零？	除说明书中提示用对照管或某种试剂调零外，都用纯水调零。
试剂盒中样本提取时需要 0.1g 组织，我的样品量不够怎么办？	通常可以按比例缩小，如说明书中是约 0.1g 组织加 1ml 提取液，可以等比例缩小，如 0.05g 组织加 0.5ml 提取液提取。后续操作不变。
	对于数量少的样品，一方面可以减少提取液体积，另一方面还可以延长反应时间。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1042BKM 葡萄糖氧化酶（GOD）检测试剂盒（微量法）

PMK1043BKM 多酚氧化酶(PPO)检测试剂盒检测试剂盒（微量法）

PMK1048BKM 二胺氧化酶(DAO)检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

