

土壤锰过氧化物酶（S-Mnp）试剂盒说明书

（微板法 48 样）

一、产品简介：

锰过氧化物酶（EC1.11.1.13, Mnp）是真菌分泌的一种糖基化的胞外蛋白，含亚铁血红素的过氧化物酶，主要存在于引起白腐的木腐菌和土壤枯草菌这两个担子真菌中，属于木质素降解酶系，能有效的降解木质素及废水和环境其他一些抗性物质，如腐殖质酸和包括多环芳烃在内的多种有机污染物等。

土壤锰过氧化物酶（S-Mnp）在 Mn^{2+} 存在的条件下，将二甲氧基苯酚（DMP）氧化生成的产物在 470nm 处有特征吸收峰。通过检测该产物在 470nm 处的增加速率，即可得到 Mnp 酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	使用前甩几下使粉剂落入底部，再加 8mL 无水乙醇溶解备用。
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	使用前甩几下使粉剂落入底部，再加 3mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂四	液体×1 支	4℃保存	使用前甩几下使液体落入底部，准备三个新的 EP 管：每管中加入 2μL 液体，再加 1mL 蒸馏水混匀备用。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、可调式移液器、天平、恒温震荡培养箱。

四、土壤锰过氧化物酶（S-Mnp）活性测定：

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：

取新鲜土样风干或者 37 度烘箱风干，先粗研磨，过 40 目筛备用。

【注】：土壤风干，减少土壤中水分对于实验的干扰；土壤过筛，保证取样的均匀细腻；

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 470nm。
- ② 所有试剂至常温状态。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
土样（g）	0.05	0.05
试剂一	200	340
试剂二	140	
试剂三	20	20
试剂四	40	40
充分混匀，30℃震荡反应 2h 后，于 12000rpm，4℃离心 10min，取 200μL 于 96 孔板中，读取 470nm 处吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个样本需做一个自身对照）。		

【注】若 ΔA 值较低，可加大土壤样本量或者延长反应时间，则改变后的样本质量 W 和反应时间

T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

酶活性定义：每克土壤每天氧化 1nmol 的 DMP 所需酶量为一个酶活力单位。

$$\text{S-MnP 活性}(\text{nmol/d/g 土样})=(\Delta A \div \epsilon \div d) \times 10^9 \times V \div W \div T=174.5 \times \Delta A \div W$$

ϵ ---DMP 被氧化的产物的摩尔消光系数：55000L/mol/cm； d---96 孔板光径，0.5cm；

V---反应总体积， 4×10^{-4} L； W---样本质量，g； T---反应时间，2h=1/12d