

土壤锰过氧化物酶（S-Mnp）试剂盒说明书

（货号：BP10099W 微板法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 8mL 无水乙醇溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 3mL 蒸馏水充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 准备四个新的 EP 管：每管中加入 10μL 液体, 再加 992μL 蒸馏水混匀备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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：

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、检测步骤：

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：

试剂组分 (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。

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

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，4×10⁻⁴L； W---样本质量，g； T---反应时间，2h=1/12d