

# 土壤焦磷酸酶(S-PPase)试剂盒

(分光法 24 样)

## 产品简介:

土壤焦磷酸酶（焦磷酸盐磷酸水解酶，EC 3.6.1.1）催化焦磷酸盐水解成正磷酸盐。在土壤有机磷的矿化和转化中发挥重要作用。

本试剂盒提供一种简单、灵敏、快速的检测方法。土壤焦磷酸酶催化焦磷酸盐水解成磷酸盐。可通过在 700nm 处测定生成的无机磷量来确定该酶活性大小。

## 试剂盒组成和配制:

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	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加入 30mL 试剂一，充分溶解备用。
试剂三	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用甩几下使试剂落入底部，再加 4.2mL 蒸馏水，混匀溶解备用
试剂五	粉体 mg×7 支	4℃保存	临用甩几下使试剂落入底部，每支再加 1.5mL 蒸馏水，混匀溶解备用，现配现用。。
标准品	粉体 1 mL×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

**【注】**：全程操作需无磷环境；试剂配置最好用新的枪头和玻璃移液器等，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

## 所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、恒温培养箱、分析天平、可调式移液器。

## 土壤焦磷酸酶活性测定:

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:

取新鲜土样或者 37 度烘箱风干 (需先粗研磨), 过 40 目筛网备用。

### 2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30 min, 调节波长到 700 nm, 蒸馏水调零。

② 反应 mix 制备: 试剂四和五按照要求加蒸馏水溶解后, 按试剂三: 四: 五=10:2:5 的比例依次混合配置 (需现配现用, 若出现蓝色则需弃掉重新配置)。

③ 在离心管中依次加入下列试剂:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
土壤样本 (g)	0.1	0.1
试剂一	550	550
试剂二	50	
混匀, 37°C 振荡培养 2 小时 (间隔 30min 振荡混匀一次)。		
试剂三	300	300
试剂四		50
立即混匀, 于 12000rpm, 室温或 4°C 离心 5min, 上清液需立即测定, 不可久置。		

③ 显色反应, 在 EP 管或 1mL 玻璃比色皿中依次加入:

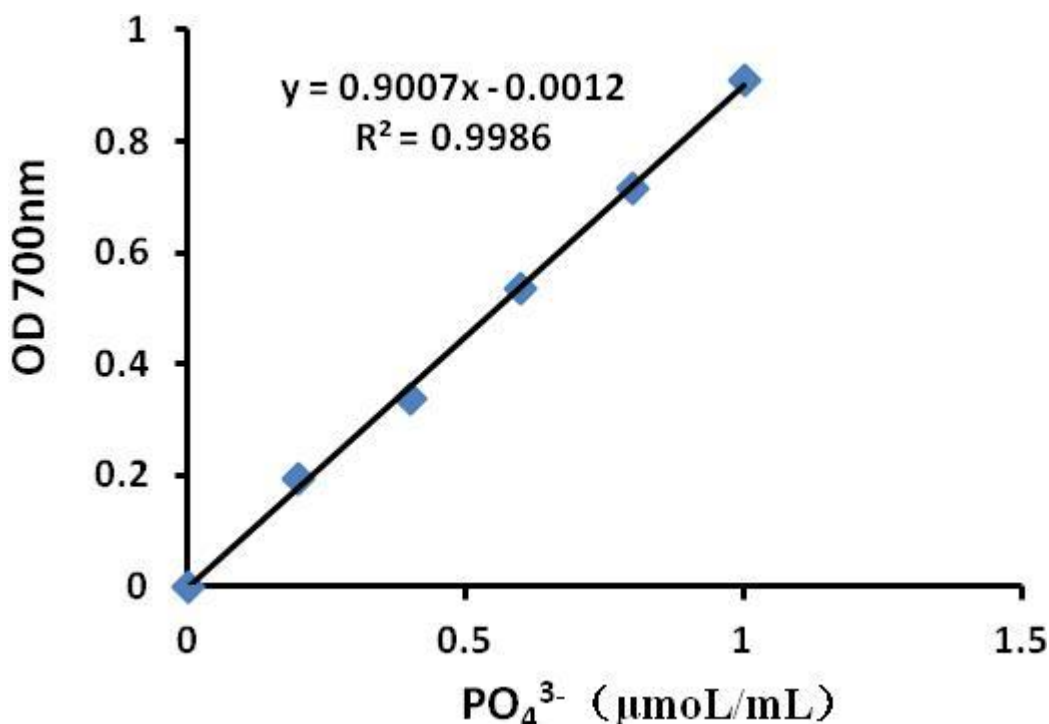
上清液	200	200
反应 mix	600	600
混匀，室温静置 15min，于 700nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照（参看注意事项）。		

**[注]:** 1. 若 $\Delta A$  的值在零附近，可延长孵育时间 T（如增至 5h）。

2. 若是同时检测同一背景下的土壤样本（如同一批样本不同时间点的取样），此批土壤样本可做一个批次的样本自身对照，节省时间。

### 结果计算:

1、**标准曲线:**  $y = 0.9007x - 0.0012$ ; x 是标准品摩尔浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )，y 是 $\Delta A$ 。



2、**活性定义:** 在 37°C，每克土壤每小时水解 1 $\mu\text{mol}$  焦磷酸产生 1 $\mu\text{mol}$  无机磷定义为 1 个酶活单位。

土壤焦磷酸酶( $\mu\text{mol/h/g}$  土样) =  $(\Delta A + 0.0012) \div 0.9007 \times V1 \div W \div T$

$$=0.5 \times (\Delta A + 0.0012) \div W$$

V1---孵育阶段整个反应体积：900 $\mu$ L=0.9mL； W---土壤样品质量，g；

T---催化反应时间，2 h；

**附：标准曲线制作过程：**

1. 制备标准品母液 (5 $\mu$ mol/mL)：标准品用 10mL 蒸馏水溶解。(母液需在两天内用)。
2. 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.  $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3. 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。