

土壤焦磷酸酶(S-PPase)试剂盒

(微板法 48 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 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 3.2mL 蒸馏水，混匀溶解备用。
试剂三	液体 32mL×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 2.2mL 蒸馏水，混匀溶解备用。
试剂五	粉体 mg×4 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：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、蒸馏水。

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 酶标仪预热 30 min，调节波长到 700 nm。

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	370	370
试剂二	30	
混匀，37°C振荡培养 2h（间隔 30min 振荡混匀一次）		
试剂三	200	200
试剂二		30
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 96 孔板中依次加入：

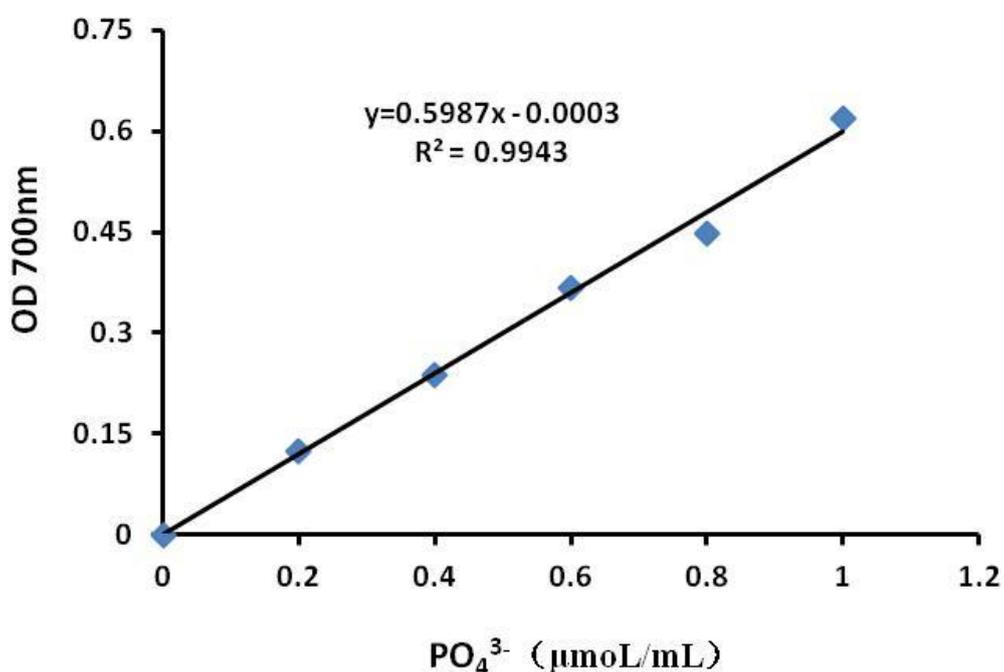
上清液	50	50
反应 mix	150	150
混匀，室温静置 15min，于 700nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照(参看注意事项)		

【注】:1. 若 ΔA 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、**标准曲线方程**: $y=0.5987x - 0.0003$; x 是标准品摩尔浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 是 ΔA 。



2、**活性定义**: 在 37°C, 每克土壤每小时水解 1 μmol 焦磷酸产生 1 μmol 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) = $(\Delta A + 0.0003) \div 0.5987 \times V1 \div W \div T$

= $0.5 \times (\Delta A + 0.0003) \div W$

V1---孵育阶段整个反应体积: $600\mu\text{L} = 0.6\text{mL}$; 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 ($5\mu\text{mol/mL}$) : 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. $\mu\text{mol/mL}$ 。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。