

土壤多酚氧化酶（Solid-Polyphenol oxidase, S-PPO）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

土壤多酚氧化酶(Polyphenoloxidase, 简称 PPO)是一类以铜、锰为活性中心的氧化还原酶，主要来源于土壤微生物、植物根系分泌物及动植物残体分解释放的酶，能把土壤中芳香族化合物氧化成醌，醌与土壤中蛋白质、氨基酸、糖类、矿物等物质反应生成大小分子量不等有机质和色素，完成土壤芳香族化合物循环，也可用于土壤环境修复。

土壤多酚氧化酶能够催化底物左旋多巴产生红色的醌类物质，依据文献选择该有色产物在 475nm 做为特征光吸收波长，通过测定进而计算得出土壤多酚氧化酶活性大小。

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 110mL×2 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×3 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，每瓶加入 30mL 试剂一，超声溶解，溶解后的试剂三天内用完。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅/恒温振荡培养箱、可调式移液器。

四、土壤多酚氧化酶（S-PPO）的测定：

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：

取新鲜土样或风干土壤，先粗研磨，过 40 目筛网，待测备用。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 475nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
土样 (g)	0.1	0.1
试剂一	200	1000
试剂二	800	
振荡混匀，25℃水浴（间隔 10min 振荡混匀几下）或恒温振荡培养箱振荡孵育 1 h		
孵育结束后立即于 4℃（需低温）12000rpm 离心 5min，取 200μL 上清液于 96 孔板中，于 475nm 处读取吸光值 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】：1. 若 A 测定大于 1.8，可用蒸馏水对离心后待检测的上清液进行稀释，则稀释倍数 D 需代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 值小于 0.01，可延长 25℃的孵育时间 T（如由 1h 可增加至 4h），则改变后的 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、单位定义：每小时每克土壤中产生 1nmol 红色产物定义为一个酶活力单位。

$$\text{S-PPO 活力}(\text{nmol/h/g 土样})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V1 \times 10^9] \div W \div T \times D = 540.5 \times \Delta A \div W \times D$$

ϵ ---红色产物摩尔吸光系数, $3.7 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; T---反应时间, 1h;
V1---反应总体积, $1000 \mu\text{L} = 1 \text{ mL} = 1 \times 10^{-3} \text{ L}$; d---光径, 0.5cm;
D---稀释倍数, 未稀释即为 1; W---土壤样本实际取样量, g。