

# 土壤焦磷酸酶活性测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

## 一、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。

## 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 80mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 6.4mL 蒸馏水，混匀溶解备用。
试剂三	液体 65mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉体 mg×1 支	4°C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°C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°C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。

## 三、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。

## 四、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，再过 60 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（ $\mu\text{L}$ ）	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℃离心 5min，上清液需立即测定，不可久置。

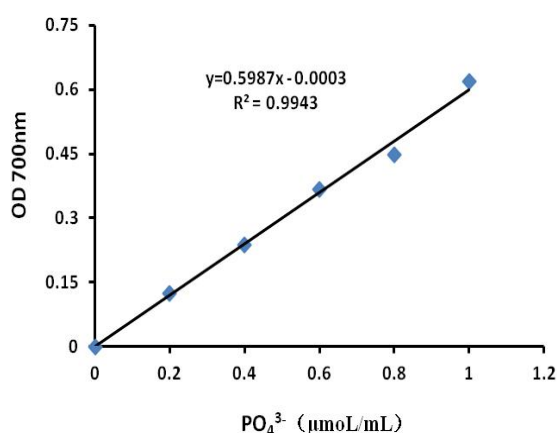
④ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.5987x - 0.0003$ ；x 是标准品摩尔浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ），y 是  $\Delta A$ 。



2、活性定义：在 37℃，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。

$$\begin{aligned} \text{土壤焦磷酸酶 } (\mu\text{mol/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0003) \div 0.5987 \times V1 \div W \div T \\ &= 0.5 \times (\Delta A + 0.0003) \div W \end{aligned}$$

V1---孵育阶段整个反应体积：600 $\mu\text{L}$ =0.6mL；

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。