

土壤焦磷酸酶活性测定试剂盒说明书

(微板法 48 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 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。

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℃ 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。

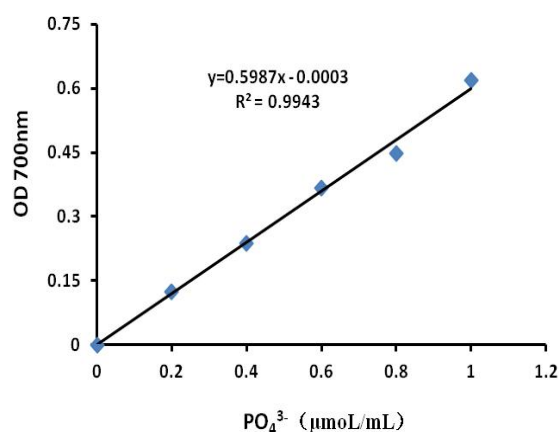
④ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

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 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。

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 ΔA 。



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。

$$\begin{aligned} \text{土壤焦磷酸酶}(\mu\text{mol/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0003) \div 0.5987 \times V_1 \div W \div T \\ &= 0.5 \times (\Delta A + 0.0003) \div W \end{aligned}$$

V_1 ---孵育阶段整个反应体积：600 μL =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。