

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

(货号: BP10124W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 110mL×2 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 3 瓶	4℃保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 30mL 试剂一, 超声溶解, 溶解后的试剂三天内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

取新鲜土样或风干土壤, 先粗研磨, 过 40 目筛网, 待测备用。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 475nm。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (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。