

土壤焦磷酸酶测定试剂盒说明书

(货号：ADS-W-TR065 微板法 48 样 有效期：6 个月)

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉体 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 3.2mL 蒸馏水，混匀溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉体 1 瓶	4℃ 避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加 2.2mL 蒸馏水，混匀溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉体 4 支	4℃ 保存	每支： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.5mL 试剂三，混匀溶解备用，现配现用。
标准品	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

【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、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：

取新鲜土样或者 37 度烘箱风干（需先粗研磨），过 40 目筛网备用。

2、检测步骤：

- 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：

试剂组分 (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：

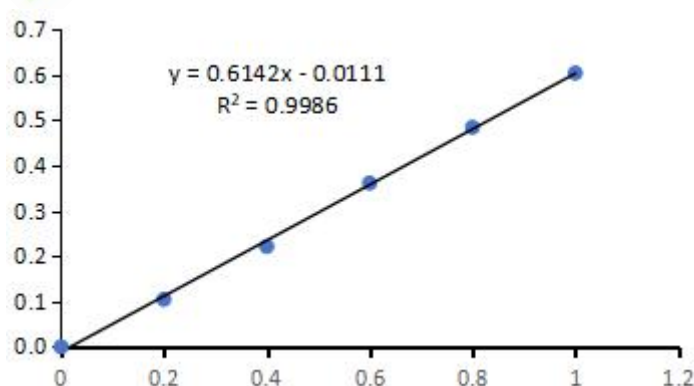
上清液	50	50
反应 mix	150	150
混匀，室温静置 15min，于 700nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （参看注意事项）。		

【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： $y = 0.6142x - 0.0111$ ；x 是标准品摩尔浓度（μmol/mL），y 是 ΔA 。



- 2、活性定义：在 37℃，每克土壤每小时水解 1μmol 焦磷酸产生 1μmol 无机磷定义为 1 个酶活单位。

$$\text{土壤焦磷酸酶}(\mu\text{mol/h/g 土样})=(\Delta A+0.0111)\div 0.6142\times V1\div W\div T$$

$$=0.488\times(\Delta A+0.0111)\div W$$

V1---孵育阶段整个反应体积：600μL=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 标准品用 1mL 蒸馏水溶解。（母液需在两天内用），标准品母液浓度为 50μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.2，0.4，0.6，0.8，1. μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 20uL，加入 980uL 蒸馏水，混匀得到 1μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		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-0 浓度管。		

