

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

(货号：G0311W 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没食子酸产生紫色没食子素，该物质在 430nm 有特征光吸收，进而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	粉剂×4 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，每瓶加入 14mL 蒸馏水，现配现用。
试剂二	液体 45mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲，则用到该试剂

## 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、石油醚或乙醚、蒸馏水。

## 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，再次研磨过 60 目筛网，待测。

### 2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 430nm。

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	500	
蒸馏水		500
试剂二	200	200
振荡混匀，30℃ 水浴或者恒温培养箱孵育 1 h		
石油醚或乙醚	1000	1000
振荡数次，静置 30min，分别从测定管的中间着色层（紫色）和对照管的中间层液体取出 200μL 于 96 孔板中，于 430nm 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）。		

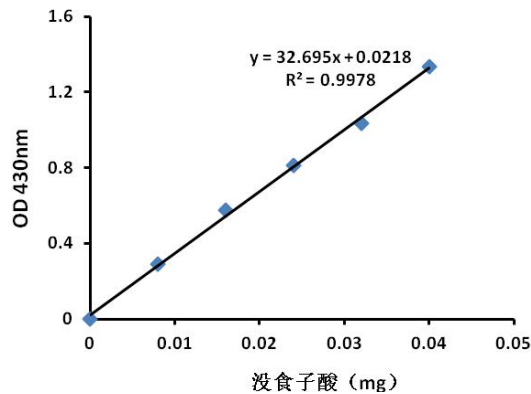
【注】：1. 若用乙醚萃取，因乙醚粘度小易掉液，吸前需先将枪头在上层液里润洗 2~3 次，再转移测定。

2. 若测定管的中间着色层颜色较深，可用蒸馏水稀释 5-10 倍，稀释倍数 D 代入计算公式参与计算。

3. 若测定管的颜色较浅即测定管 A 值在零附近徘徊，可于 30℃ 培养 1h 延长培养时间至 5h 或更长，则改变后的反应时间 T 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y=32.695x+0.0218$ ；x 为标准品质量（mg），y 为吸光值 $\Delta A$ 。



2、单位定义：每小时每克土壤中产生 1mg 紫色没食子素定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-PPO 活力 (mg/h/g 土样)} &= [(\Delta A - 0.0218) \div 32.695] \div (W \times V1 \div V2) \times D \div T \\ &= 0.153 \times (\Delta A - 0.0218) \div W \end{aligned}$$

V1----加入 96 孔板中的液体体积，200 $\mu$ L=0.2mL；

V2----EP 管中加入的有机相的体积，1000 $\mu$ L=1mL；

T----反应时间，1h；

W----土壤样本实际取样量，g。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（0.2mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL0.5N 的盐酸（416.7 $\mu$ L 的盐酸，加蒸馏水定容至 10mL）（母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C 保存）。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 加 200 $\mu$ L 的不同浓度的标准品于 96 孔板中，于 430nm 读取吸光值 A，根据结果即可制作标准曲线。