

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

（分光法 48 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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×2 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,每瓶加入 25mL 试剂一,超声溶解,溶解后的试剂三天内用完。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅/恒温振荡培养箱、可调式移液器。

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,待测备用。

2、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 475nm,蒸馏水调零。
- 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	200	1000
试剂二	800	
振荡混匀, 25℃水浴 (间隔 10min 振荡混匀几下) 或者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 700μL 上清液至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 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。

$$S\text{-PPO 活力}(\text{nmol/h/g 土样})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_1 \times 10^9] \div W \div T \times D = 270.3 \times \Delta A \div W \times D$$

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；

V_1 ---反应总体积， $1000\mu\text{L}=1\text{mL}=1 \times 10^{-3} \text{ L}$ ；

d---光径，1cm；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

W---土壤样本实际取样量，g。