

土壤磷酸二酯酶(S-PDE)试剂盒

(微板法 48 样)

产品简介:

土壤磷酸二酯酶 (S-PDE, EC 3.1.4.1) 是在土壤磷酸单酯酶之后的的第二大磷酸酶。其在土壤有机磷的循环代谢中起到重要作用。

本试剂盒提供一种简单、灵敏、快速的检测方法。土壤磷酸二酯酶 (S-PDE) 催化双(4-硝基苯)磷酸酯 (BNPP) 生成黄色的产物 PNP, 该产物在 405nm 处有最大吸收峰。通过检测 PNP 在 405nm 下的增加速率, 即可得到 S-PDE 酶活性大小。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×6 支	4℃保存	临用前每支甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支再加 2mL 蒸馏水充分溶解, 现配先用, 两天内用完。
试剂三	液体 40mL×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

所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅或恒温培养箱、天平、可调式移液器。

土壤磷酸二酯酶 (S-PDE) 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：

取新鲜土样或干土（风干或者 37 度烘箱风干），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 405 nm。

② 在离心管中依次加入下列试剂：

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管
土样	0.1g 鲜土或 0.05g 干土	0.1g 鲜土或 0.05g 干土
试剂一	500	500
蒸馏水	100	
37°C（水浴锅或恒温培养箱）振荡反应 1 h		
试剂三	400	400
混匀，12000rpm 室温离心 5min，立即取上清液 200 μL 于 96 孔板中，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （参考注意事项）。		

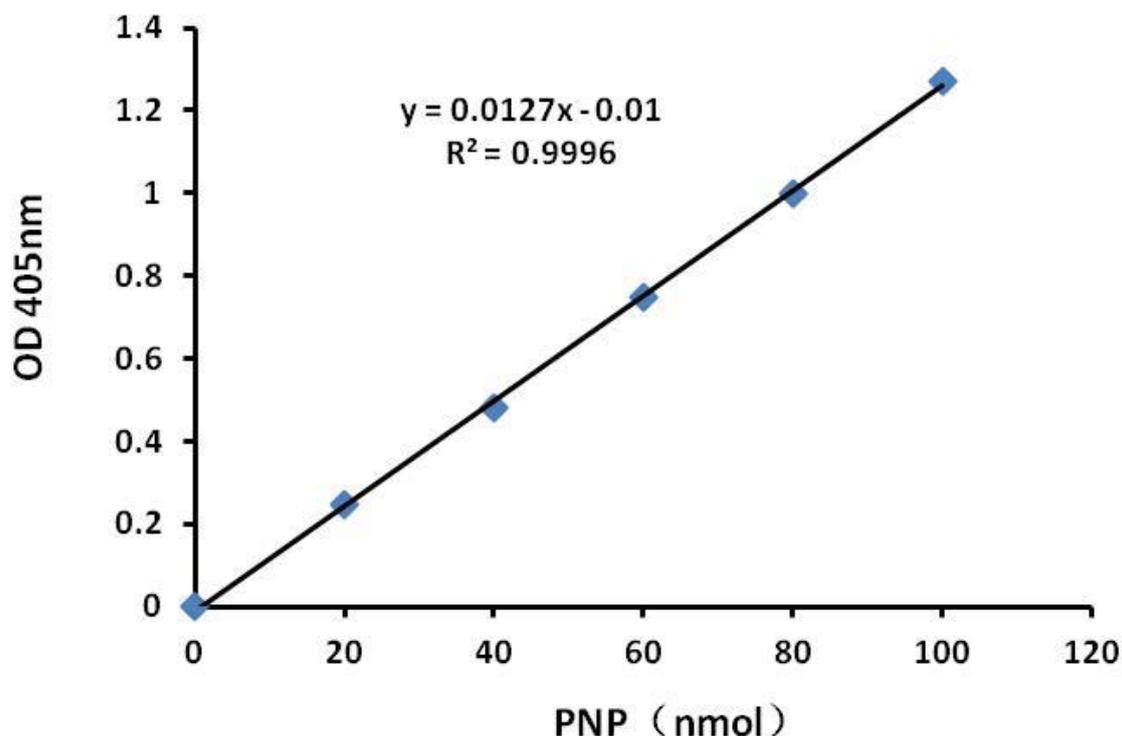
【注】:1.若 A 测定超过 1.5，可对最后一步的待检测上清液(测定管和对照管)同时进行稀释（用水稀释即可），稀释倍数 D 代入计算公式；

2.若 ΔA 在零附近徘徊，可延长 37°C的孵育时间 T（如增至 4 小时或更长），或增加土样质量 W（如增至 0.2g）。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

3.若同时检测同一背景下的土壤样本，此批土壤样本可做做三次样本自身对照管（取平均值作为这批土壤样本的对照管），节省时间；若是不同背景下的土壤样本（如黑土，红土，黄土等），则每个样本需做一个自身对照，即按照说明书加样表操作即可，

结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0127x - 0.01$; x 是 PNP 摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA 。



2、活性定义: 在 37°C, 每克土壤每小时水解 BNPP 产生 1nmol PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$S\text{-PDE}(\text{nmol/h/g 土样}) = [(\Delta A + 0.01) \div 0.0127] \div W \div T \times D = 78.74 \times (\Delta A + 0.01) \div W \times D$$

W---土壤样品质量, g; D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

T---催化反应时间, 1 h; PNP 相对分子质量---139.11。

附: 标准曲线制作过程:

1 制备标准品母液 (10 μ mol/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解,

若有结晶析出, 需 37°C 水浴至完全溶解。

- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管中直接加入：10 μL 标准品+590 μL 试剂一+400 μL 试剂三，混匀，立即取上清液 200 μL 于 96 孔板中，立即于 405nm 下读取吸光值 A。
- 4 根据结果制作标准曲线。