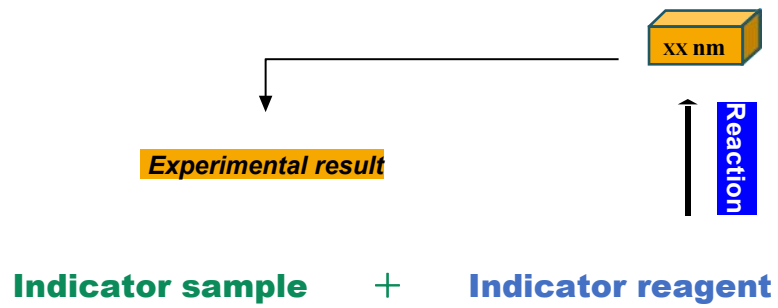


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

土壤磷酸二酯酶（S-PDE）活性测定试剂盒说明书 微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

一、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。

二、试剂盒组分与配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 120mL × 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4mL蒸馏水充分溶解，现配先用，两天内用完。
试剂三	液体 80mL × 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、台式离心机、水浴锅或恒温培养箱、天平、可调式移液器。

四、土壤磷酸二酯酶（S-PDE）活性测定：

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
试剂二	100	
37℃（水浴锅或恒温培养箱）振荡反应 1h		
试剂三	400	400
试剂二		100

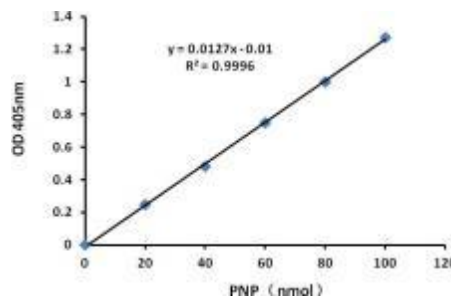
混匀，12000rpm 室温离心5min，立即取上清液200 μL于96孔板中，立即于405nm下读取吸光值A， $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ （参考注意事项）。

【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，

五、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 $\mu\text{mol/mL}$ ）：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。