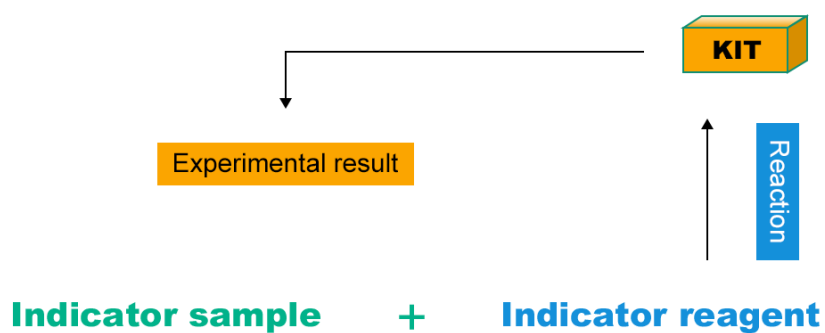


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0958

Size: 100T/96S

土壤磷酸二酯酶 (S-PDE) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

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、试剂的组成和配置:

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

五、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：

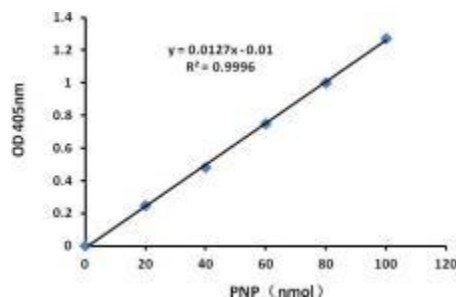
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
土样	0.1g 鲜土或 0.05g 干土	0.1g 鲜土或 0.05g 干土
试剂一	500	500
试剂二	100	
37°C (水浴锅或恒温培养箱) 振荡反应 1h		
试剂三	400	400
试剂二		100
混匀，12000rpm 室温离心 5min，立即取上清液 200 μL 于 96 孔板中，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (参考注意事项)。		

【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，

六、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。

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

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。