

## 土壤磷酸二酯酶（S-PDE）活性测定试剂盒说明书

(货号:G0340W48 微板法 48 样)

### 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:

| 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 蒸馏水混匀，取混合液检测即可。现配现用，三天内用完。 |
| 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                                          |

### 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 1 h                                                                                               |                   |                   |
| 试剂三                                                                                                                  | 400               | 400               |
| 试剂二                                                                                                                  |                   | 100               |
| 混匀，12000rpm 室温离心 5min，立即取上清液 200μL 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）。 |                   |                   |

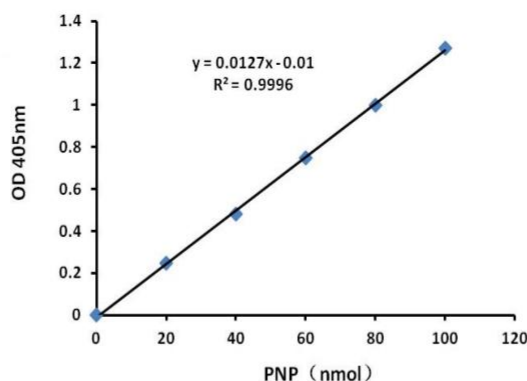
【注】: 1. 若 A 测定超过 1.5，可对最后一步的待检测上清液(测定管和对照管)同时进行稀释（用水稀释即可），稀释倍数 D 代入计算公式；

2. 若  $\Delta A$  在零附近徘徊，可延长 37℃ 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  $\Delta A$ 。



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 $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ L 标准品+590 $\mu$ L 试剂一+400 $\mu$ L 试剂三，混匀，立即取上清液 200 $\mu$ L 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。