

土壤核酸酶活性测定试剂盒说明书

(分光法 24 样)

一、产品简介：

核酸是土壤有机磷的组分之一，在核酸酶的作用下，核酸经过多步分解最终释放出无机磷，水解产物是植物的磷源之一。土壤核酸酶的活性通过度量土壤核苷酸酶的活性测得。

土壤核酸酶即土壤核苷酸酶通过水解底物核糖核苷酸生成无机磷和其他物质，无机磷在酸性环境中与钼酸铵反应生成蓝色复合物，通过在 700nm 处检测该有色物质的生成速率即可计算土壤核酸酶活性大小。

二、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 35mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加入 30mL 试剂一，充分溶解备用，
试剂三	液体 25mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加入 5mL 蒸馏水，充分溶解备用。
试剂六	粉剂 mg×3 支	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部，每支再加入 1.5mL 蒸馏水，现配现用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

【注】：全程操作需无磷环境；试剂配置最好用新的枪头和玻璃移液器等，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

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）、天平、低温离心机、恒温水浴锅，可调式移液器。

四、土壤核酸酶活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样本情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

取新鲜土样风干或者 30°C烘箱风干，先粗研磨，过 40 目筛，备用。

【注】：土壤风干，减少土壤中水分对于实验的干扰；土壤过筛，保证取样的均匀细腻；

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 700nm，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
土壤样本 (g)	0.1	0.1
试剂二	500	
混匀, 37°C振荡培养 2h (间隔 30min 振荡混匀一次)		
试剂三	500	500
试剂二		500
立即混匀, 于 12000rpm, 室温或 4°C离心 10min,		

上清液需立即测定，不可久置。

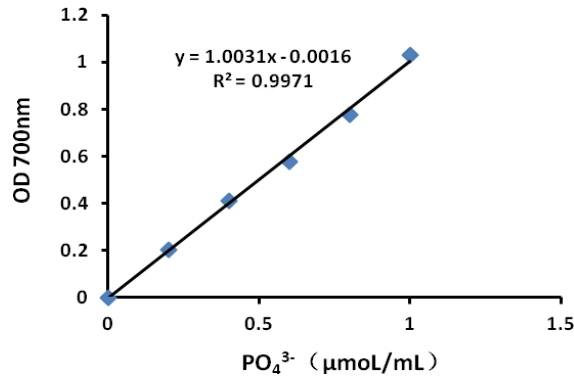
③ 显色反应，在 EP 管中依次加入：

上清液	160	160
试剂四	400	400
试剂五	80	80
试剂六	80	80
混匀，室温静置 10min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中，于 700nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定 - A 对照(每个样本需做一个自身对照)。		

【注】：若 ΔA 值在零附近徘徊，可在 37°C 孵育阶段延长反应时间 T(如增至 3h 或更长)，或增加土壤样本量 W(如增至 0.2g)，则改变后的反应时间 T 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 1.0031x - 0.0016$ ，x 是标准品摩尔浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 是 ΔA 。



2、酶活定义：37°C 条件下，每克土样每小时释放出 $1\mu\text{mol}$ 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{土壤核酸酶活性}(\mu\text{mol/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0016) \div 1.0031 \times V1 \div W \div T \\ &= 0.5 \times (\Delta A + 0.0016) \div W\end{aligned}$$

V1---孵育阶段的反应总体积，1mL； T---反应时间，2h； W---样本质量，g；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 ($5\mu\text{mol/mL}$)：标准品用 10mL 蒸馏水溶解。(母液需在两天内用)。
- 2 把母液用试剂一稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。