

土壤磷酸二酯酶（S-PDE）活性测定试剂盒说明书

(微板法 96 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 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 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 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）。		

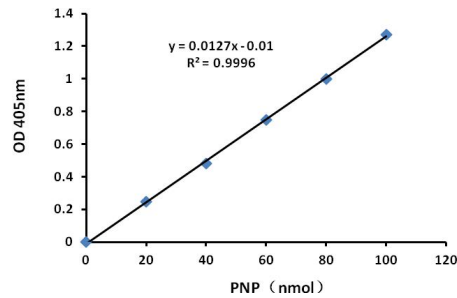
【注】：1.若 A 测定超过 1.5，可对最后一步的待检测上清液(测定管和对照管)同时进行稀释（用水稀释即可），稀释倍数 D 代入计算公式；

2.若 ΔA 在零附近徘徊，可延长 37℃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。