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 蒸馏水混匀，取混合液检测即可。**现配现用，三天内用完**。
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 200μL 于 96 孔板中，**立即**于 405nm 下读取吸光值 A，△A= A 测定- A 对照（参考注意事项）。		

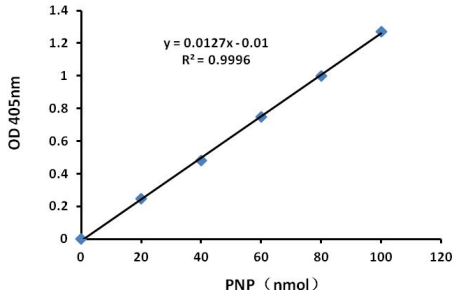
【注】：1.若 A 测定超过 1.5，可对最后一步的待检测上清液(测定管和对照管)同时进行稀释（用水稀释即可），稀释倍数 D 代入计算公式；

2.若ΔA 在零附近徘徊，可延长 37℃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△A。



2、活性定义：在 37℃，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 土样)=[(△A+0.01)÷0.0127]÷W÷T×D=78.74×(△A+0.01)÷W×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（10μmol/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℃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 μmol/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：10μL 标准品+590μL 试剂一+400μL 试剂三，混匀，立即取上清液 200μL 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。