

土壤磷酸二酯酶(S-PDE)活性测定试剂盒

分光法 24 样

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。

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 60mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂二 | 粉剂 mg×4 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 蒸馏水充分溶解, 现配先用, 两天内用完。 |
| 试剂三 | 液体 20mL×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。 |

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、水浴锅或恒温培养箱、天平、可调式移液器。

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 可见分光光度计预热 30 min, 调节波长到 405 nm, 蒸馏水调零。

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 1 h。 | | |
| 试剂三 | 400 | 400 |
| 试剂二 | | 100 |
| 震混匀, 12000rpm 室温离心 5min, 立即取全部上清液至 1mL 比色皿 (光径 1cm) 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 1.8, 可对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。

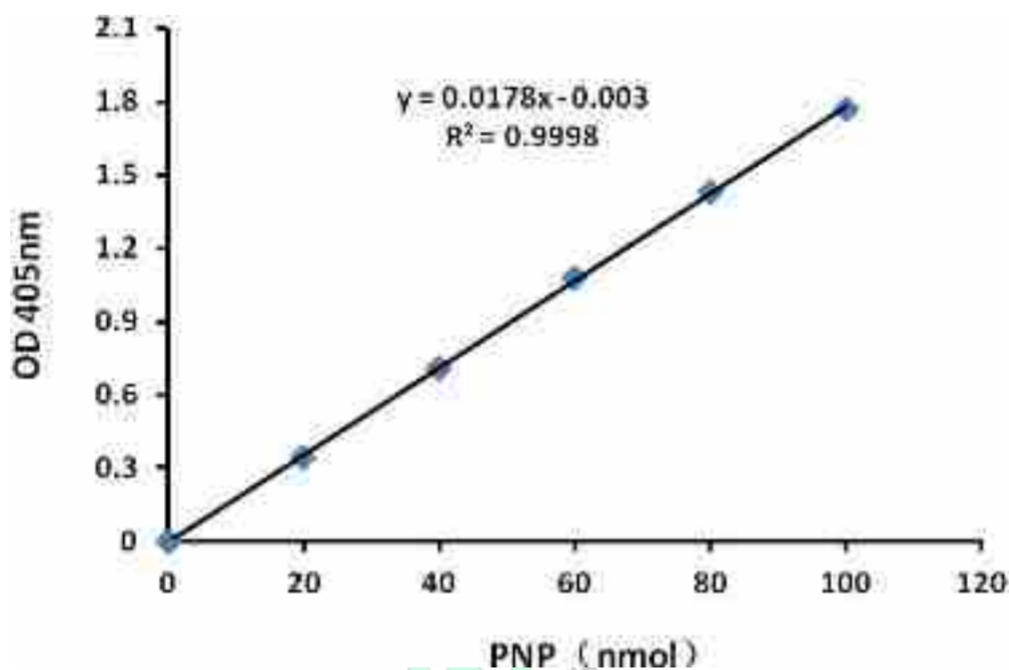
2. 若 ΔA 在零附近徘徊, 可延长 37°C的孵育时间 T (如增至 4 小时或更长), 或增加土样质量 W (如增至 0.2g)。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

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。

结果计算:

1、标准曲线方程:

$y = 0.0178x - 0.003$; x 是 PNP 摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA 。



2、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。

$$S\text{-PDE}(\text{nmol/h/g 土样}) = [(\Delta A + 0.003) \div 0.0178] \div W \div T \times D = 56.2 \times (\Delta A + 0.003) \div W \times D$$

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 μ L 标准品+590 μ L 试剂一+400 μ L 试剂三，混匀，立即全部上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 405nm 下读取吸光值 A。
4. 根据结果制作标准曲线。

mlbio 酶联生物
Good elisakit producers