

土壤芳基硫酸酯酶试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TR042 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

土壤芳基硫酸酯酶 (EC 3.1.6.1) 来自于土壤微生物, 能酶促土壤有机硫化物转化为植物可吸收的无机态硫, 在硫素的生物化学循环和植物的硫营养代谢中具有重要的作用, 是反映土壤质量的一个重要生物学指标。

土壤芳基硫酸酯酶(S-ASF)能够催化对-硝基苯硫酸钾生成对-硝基苯酚 (PNP), 后者在 410nm 有特征光吸收。通过测定 410nm 光吸收增加速率, 即可计算 S-ASF 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂 2 支	-20°C 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.5mL 试剂二溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 33mL×1 瓶	4°C 避光保存	
试剂三	液体 25mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C 避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、甲苯、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本的制备:

取新鲜土样风干或者 37°C 烘箱风干, 先粗研磨, 过 40 目筛网备用。

【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、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 410nm。
- ② 在 EP 管中依次加入：

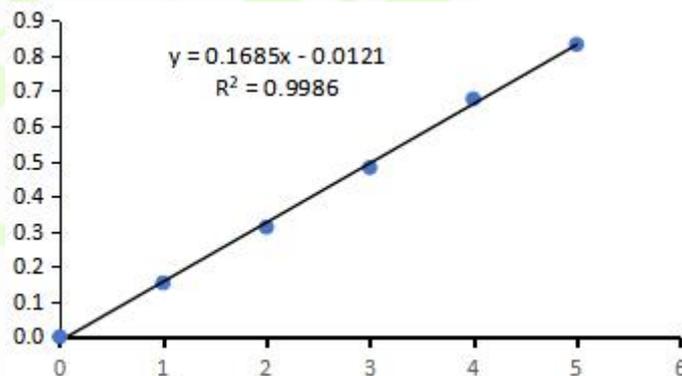
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
土样 (g)	0.05	0.05
甲苯	10	10
振荡混匀，使土样全部湿润，室温放置 10min		
试剂一	50	
试剂二	200	250
混匀，37°C 振荡反应 1h		
试剂三	250	250
混匀，室温静置 2min，12000rpm 室温离心 10min，取 200μL 上清液于 96 孔板中，于 410nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个自身对照）。		

【注】：1.若 ΔA 过小，可以增加土样量（如至 0.1g）或延长保温时间（如：2h 或更长），重新调整的样本量 W 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

2.若 A 测定超过 1.5，可取 100μL 上清液加 100μL 蒸馏水（相当于稀释 2 倍）于 96 孔板中检测，或者减少土样量，或者降低保温时间（如：10min），则稀释倍数 D 和重新调整的样本量 W 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.1685x - 0.0121$ ；x 为标准品质量 (μg)，y 为吸光值 ΔA 。



- 2、单位定义：每小时每克土样中产生 1μg 对-硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活力单位。

$$\text{土壤芳基硫酸酯酶(S-ASF)活性}(\mu\text{g/h/g 土样}) = (\Delta A + 0.0121) \div 0.1685 \div W \div T$$

$$= 5.93 \times (\Delta A + 0.0121) \div W$$

T---反应时间，1h；

W---实际称取干土质量；

PNP 相对分子质量---139.11。

附：标准曲线制作过程：

- 1 向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水，标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5mg/mL 的标品稀释液待用。

标品浓度 mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
蒸馏水		10
甲苯	10	10
试剂二	240	240
试剂三	250	250
取 200μL 至 96 孔板中，于 410nm 下读取吸光值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		