

土壤芳基硫酸酯酶（S-ASF）试剂盒说明书

（货号：BP10093F 分光法 24 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℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃ 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 25mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液 23mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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℃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 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 410nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
土样（g）	0.1	0.1
甲苯	18	18
振荡混匀，使土样全部湿润，室温放置 10min		
试剂一	90	
试剂二	360	450

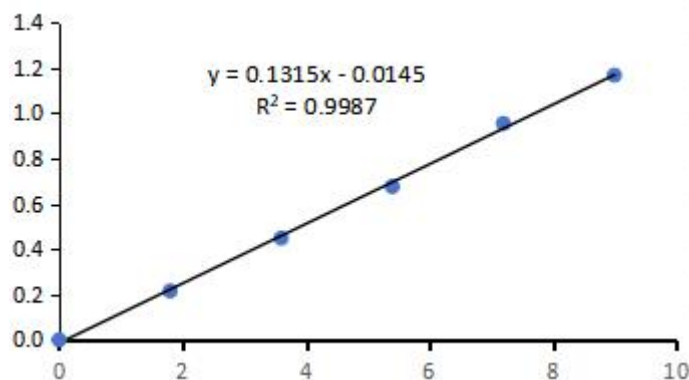
混匀, 37°C振荡反应 1h		
试剂三	450	450
混匀, 室温静置 2min, 12000rpm 室温离心 10min, 取全部上清液于 1mL 玻璃比色皿中, 于 410nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A - A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需做一个自身对照)。		

【注】: 1.若 ΔA 过小, 可以增加土样量 (如至 0.2g) 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, 可取一半上清液加等体积蒸馏水 (相当于稀释 2 倍) 于 1mL 玻璃比色皿中检测, 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: $y = 0.1315x - 0.0145$; 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 $1\mu\text{g}$ 对-硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤芳基硫酸酯酶(S-ASF)活性}(\mu\text{g/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0145) \div 0.1315 \div W \div T \\ &= 7.6 \times (\Delta A + 0.0145) \div W \end{aligned}$$

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:

- 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。
- 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。						

- 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	18	
蒸馏水		18
甲苯	18	18
试剂二	432	432
试剂三	450	450
混匀，取全部上清液于 1mL 玻璃比色皿中，于 410nm 下读取吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - 0 \text{ 浓度管}$ 。		