

土壤核酸酶活性测定试剂盒说明书

(货号：ADS-F-TR063 分光法 24 样 有效期：6 个月)

一、指标介绍：

核酸是土壤有机磷的组分之一，在核酸酶的作用下，核酸经过多步分解最终释放出无机磷，水解产物是植物的磷源之一。土壤核酸酶的活性通过度量土壤核苷酸酶的活性测得。

土壤核酸酶即土壤核苷酸酶通过水解底物核糖核苷酸生成无机磷和其他物质，无机磷在酸性环境中与钼酸铵反应生成蓝色复合物，通过在 700nm 处检测该有色物质的生成速率即可计算土壤核酸酶活性大小。

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	液体 35mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C 保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 30mL 试剂一，充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 25mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	粉剂 1 瓶	4°C 避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 5mL 蒸馏水，充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	粉剂 3 支	4°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 蒸馏水，现配现用。
标准品	粉剂 1 支	4°C 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。

【注】：全程操作需无磷环境；试剂配置最好用新的枪头和玻璃移液器等，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

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、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样本情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本提取：

取新鲜土样风干或者 30°C 烘箱风干，先粗研磨，过 40 目筛，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 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 700nm，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
土壤样本 (g)	0.1	0.1
试剂二	500	
混匀，37°C 振荡培养 2h (间隔 30min 振荡混匀一次)		
试剂三	500	500
试剂二		500
立即混匀，于 12000rpm，室温或 4°C 离心 10min， 上清液需立即测定，不可久置。		

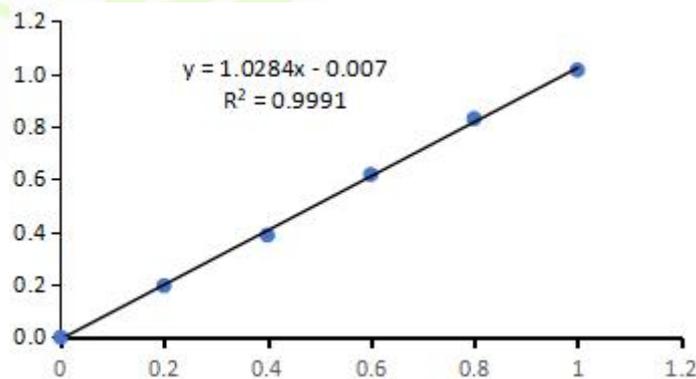
- ③ 显色反应，在 EP 管中依次加入：

上清液	160	160
试剂四	400	400
试剂五	80	80
试剂六	80	80
混匀，室温静置 10min，全部液体转移至 1mL 玻璃 比色皿(光径 1cm)中，于 700nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需做一个自身对照)。		

【注】：若 ΔA 值在零附近徘徊，可在 37°C 孵育阶段延长反应时间 T (如增至 3h 或更长)，或增加土壤样本量 W (如增至 0.2g)，则改变后的反应时间 T 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 1.0284x - 0.007$ ，x 是标准品摩尔浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 是 ΔA 。



- 2、酶活定义：37°C 条件下，每克土样每小时释放出 $1\mu\text{mol}$ 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤核酸酶活性}(\mu\text{mol/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.007) \div 1.0284 \times V_1 \div W \div T \\ &= 0.486 \times (\Delta A + 0.007) \div W \end{aligned}$$

V1---孵育阶段的反应总体积，1mL；

T---反应时间，2h；

W---样本质量，g；

附：标准曲线制作过程：

1 标准品用 10mL 蒸馏水溶解。（母液需在两天内用），标准品母液浓度为 5 $\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用试剂一稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. $\mu\text{mol/mL}$ 。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 200 μL ，加入 800 μL 蒸馏水，混匀得到 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
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 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，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	160	
蒸馏水		160
试剂四	400	400
试剂五	80	80
试剂六	80	80
混匀，室温静置 10min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中，于 700nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		