

土壤芳基硫酸酯酶（Solid-aryl sulfatase, S-ASF）试剂盒说明书

（微板法 48 样）

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	用前甩几下使试剂落入底部，每支加 1.5mL 试剂二溶解备用。
试剂二	液体 23mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液 25mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、甲苯（自备）和蒸馏水。

四、土壤芳基硫酸酯酶（S-ASF）活性测定：

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

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、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 410nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ 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℃振荡反应 1h		
试剂三	250	250
混匀，室温静置 2min，12000rpm 室温离心 10min，取 200 μL 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）。		

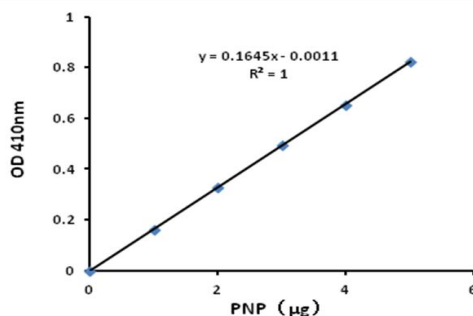
【注】：1.若 ΔA 过小，可以增加土样量（如至 0.1g）或延长保温时间（如：2h 或更长），重新调整的样本量 W 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

2.若 A 测定超过 1.5，可取 100 μL 上清液加 100 μL 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： $y = 0.1645x - 0.0011$ ；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。

$$\begin{aligned} \text{土壤芳基硫酸酯酶(S-ASF)活性}(\mu\text{g/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.1645 \div W \div T \\ &= 6.08 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \end{aligned}$$

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：

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL)：向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入： $10\mu\text{L}$ 标准品+ $10\mu\text{L}$ 甲苯+ $240\mu\text{L}$ 试剂二+ $250\mu\text{L}$ 试剂三，混匀，取 $200\mu\text{L}$ 至 96 孔板中，于 410nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。