

土壤中性磷酸酶（S-NP）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

土壤磷酸酶是催化土壤有机磷矿化的酶，其活性的高低直接影响着土壤中有机磷的分解转化及其生物有效性，是评价土壤磷素生物转化方向与强度的指标。磷酸酶活性受到土壤碳、氮含量、有效磷含量和pH的显著影响，根据最适PH范围，一般把土壤磷酸酶分为中性、酸性和碱性三种类型。

测定原理：

中性环境中，S-NP催化磷酸苯二钠水解生成苯酚和磷酸氢二钠，通过测定酚的生成量即可计算出NP活性。

自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、台式离心机、37℃恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、冰、蒸馏水、乙醇和甲苯。

试剂组成和配制：

试剂一：液体×1瓶，4℃避光保存。

试剂二：粉剂×1瓶，4℃保存。用前加100mL蒸馏水充分溶解。

试剂三：液体×1瓶，4℃保存。

试剂四：粉剂×1瓶，4℃避光保存。临用前加576μL无水乙醇（自备），24μL蒸馏水充分溶解。（变褐色后不能再使用）

标准品：液体×1瓶，0.5 μmol/mL酚标准液，4℃保存。

催化反应：

称取风干混匀土壤约0.1g，加入50μL甲苯（自备），轻摇15min；加400μL试剂一并且摇匀后，置于37℃恒温培养箱，开始计时，催化反应24h；到时时迅速加入1mL试剂二充分混匀，以终止酶催化的反应。8000g，25℃离心10min，取上清液置于冰上待测。

显色反应：

1. 分光光度计预热30 min以上，调节波长到660 nm，蒸馏水调零。
2. **空白管：**取微量玻璃比色皿/酶标板，加入10μL蒸馏水，20μL试剂三，4μL试剂四，充分混匀，显色后再加蒸馏水166μL，混匀后25℃静置30min，于660nm测定吸光度，记为A空白管。
3. **标准管：**取微量玻璃比色皿/酶标板，加入10μL标准液，20μL试剂三，4μL试剂四，充分混匀，显色后再加蒸馏水166μL，混匀后25℃静置30 min，于660nm测定吸光度，记为A标准管。
4. **测定管：**取微量玻璃比色皿/酶标板，加入10μL上清液，20μL试剂三，4μL试剂四，充分混匀，显色后再加蒸馏水166μL，混匀后室温25℃30 min，于660nm测定吸光度，记为A测定管。

注意：空白管和标准管只需测定一次。

S-NP活性计算：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

活性单位定义：37℃中每克土壤每天释放1nmol酚为1个酶活单位。

$$S-NP (\mu\text{mol/d/g 土样}) = [C\text{标准液} \times (A\text{测定管} - A\text{空白管}) \div (A\text{标准管} - A\text{空白管})] \times V\text{总} \div W \div T$$

$$= 0.725 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div W$$

C标准液：0.5 μ mol/mL；V总：催化体系总体积，1.45mL；W：土壤样品质量，g；T：催化反应时间，24 h=1 d。

www.affandi-e.com