

土壤中性磷酸酶测试盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
SMHA3-C24	土壤中性磷酸酶(S-NP)试剂盒	24T	常量法
SMHA3-C48		48T	

一、测定意义：

土壤磷酸酶是土壤中的一种重要的酶类，参与有机磷的转化，可加速有机磷的脱磷速度，其活性高低于土壤中有机磷含量和 pH 值相关，可作为评价磷素生物转化方向和强度的指标。根据最适 pH 范围，可分为酸性、中性、碱性三种类型。

二、测定原理：

以磷酸苯二钠为底物，在中性条件下，土壤中性磷酸酶可催化底物水解生成苯酚和磷酸氢二钠。苯酚与 4-氨基安替比林作用，经铁氰化钾氧化生成醌衍生物，根据红色深浅可测定计算中性磷酸酶的活性。

三、试剂盒组成：

试剂名称	试剂装量（24T）	试剂装量（48T）	保存条件
甲苯	自备	自备	常温
试剂一	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	8mL×1 瓶	16mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂四	45mL×1 瓶	80mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂五	7mL×1 瓶	14mL×1 瓶	2-8℃ 避光保存
试剂六	7mL×1 瓶	14mL×1 瓶	2-8℃ 避光保存
标准品(1mg/mL)	1.5mL×1 支	1.5mL×1 支	2-8℃ 保存

四、操作步骤：

一、样本前处理

新鲜土样自然风干或者 37℃ 烘箱风干，过 30-50 目筛。

二、操作步骤

1、培养反应：

	测定管	对照管	基质管
土样 (g)	0.1	0.1	-
甲苯 (μL)	50	50	50
震荡混匀，使土样全部湿润，室温静置 15min			
试剂一 (μL)	250	250	250

蒸馏水 (μL)	-	250	-
试剂二 (μL)	250	-	250
混匀, 37°C 孵育 24h			
试剂三 (μL)	500	500	500

混匀, 10000 转/min 常温离心 10min, 取上清液备用。

2、显色反应:

	测定管	对照管	基质管	标准管
上清液 (μL)	100	100	100	-
不同浓度的标准品 (μL)	-	-	-	100
试剂四 (μL)	700	700	700	700
试剂五 (μL)	100	100	100	100
试剂六 (μL)	100	100	100	100

混匀, 静置 10min, 波长 570nm, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测定各管吸光度值。

注: 每个待测样本需设定一个测定管和一个对照管;

五、单位定义与计算:

单位定义: 每天每克风干土壤中释放 1mg 酚为一个酶活力单位

计算公式: 根据标准曲线, 将吸光度值带入标曲计算出上清液中浓度 Y (mg/mL)

$$S-NP(U/g \text{ 土样}) = (Y_{\text{测定管}} - Y_{\text{对照管}}) \times V_{\text{反应}} \div W \div T$$

T: 反应时间, 1d;

V_{反应}: 反应体系总体积, 1.0mL;

W: 样本质量, 0.1g。

计算举例: 取土样 0.1g 实验, 测定管上清液 5 倍稀释, 对照管未稀释, 测得测定管吸光度为 0.419, 对照管吸光度为 0.031, 按计算公式计算得:

根据标准曲线, 得到 $Y_{\text{测定管}} = 0.190 \text{ mg/mL}$, $Y_{\text{对照管}} = 0.001 \text{ mg/mL}$

$$S-NP(U/g \text{ 土样}) = (0.190 - 0.001) \times 1.0 \div 0.1 \div 1 - 0.001 \times 1.0 \div 0.1 \div 1 = 1.89 \text{ (U/g)}$$

六、注意事项:

- 1、比色时, 溶液呈现红色, 在 2h 内保持稳定
- 2、不同土壤样本的中性磷酸酶差异较大, 先做预实验确认样本稀释倍数。通常情况下测定管需要 1-10 倍稀释, 对照管和基质管不稀释。
- 3、标准曲线可用于参考, 不同实验条件下, 测定结果趋势不变, 但数据值可能会存在一定的差异性。

附录 I：标准曲线的制备

1、前处理：

将 1mg/mL 的标准品用蒸馏水稀释成 0、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1mg/mL 标准液进行标准曲线的制备。

2、操作表：

标准品浓度 (mg/mL)	0	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
标准品 (μ L)	100	100	100	100	100	100	100
试剂四 (μ L)	700	700	700	700	700	700	700
试剂五 (μ L)	100	100	100	100	100	100	100
试剂六 (μ L)	100	100	100	100	100	100	100

混匀，静置 10min，波长 570nm，1cm 光径，蒸馏水调零，测定各管吸光度值

3、测定结果：

标准品浓度 (mg/mL)	吸光度值	绝对吸光度值
0.00	0.008	0.000
0.01	0.077	0.062
0.02	0.127	0.119
0.04	0.263	0.245
0.06	0.384	0.366
0.08	0.490	0.482
0.10	0.612	0.604