

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
SMHA4-M48	土壤中性磷酸酶(S-NP)试剂盒	48T	微量法
SMHA4-M96		96T	

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，其活性高低与土壤有机磷含量和 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，可分为中性、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、试剂组成

试剂名称	试剂装量 (48T)	试剂装量 (96T)	保存条件
甲苯	自备	自备	室温保存
试剂一	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	6mL×1 瓶	12mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂三	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂四	25mL×1 瓶	50mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂五	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃ 避光保存
试剂六	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃ 避光保存
标准品(1mg/mL)	1.5mL×1 支	1.5mL×1 支	4℃ 保存

四、操作步骤

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。

操作步骤

1、培养反应

	测定管	对照管	基质管
土样 (g)	0.025	0.025	-
甲苯 (μL)	10	10	10
震荡混匀，使土样全部湿润，室温静置 15min			
试剂一 (μL)	100	100	100

蒸馏水 (μL)	-	100	-
试剂二 (μL)	100	-	100
混匀, 37°C 孵育 24h			
试剂三 (μL)	125	125	125

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)	20	20	20	-
不同浓度的标准品 (μL)	-	-	-	20
试剂四 (μL)	140	140	140	140
试剂五 (μL)	20	20	20	20
试剂六 (μL)	20	20	20	20

混匀, 静置 10min, 波长 570nm, 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; 基质管只需做 1 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)

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

T: 反应时间, 1d;

V_{反应}: 反应体系总体积, 0.325mL;

W: 样本质量, 0.025g。

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。

七、公司介绍

陌凡生物科技有限公司是一家专业从事转基因检测、食品安全以及动植物疫病检测为核心业务的生物科技公司。能够为客户提供动植物疫病检测试剂、小分子抗原抗体、植物激素、植物抗体、重组蛋白等优质产品。自主研发了涵盖分子生物学、细胞生物学、免疫学、生物医学等领域的各种试剂盒。产品覆盖面广, 品质可靠。

附录 I：中性磷酸酶标准曲线的制备

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、0.1、0.2mg/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	0.2
标准品 (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20
试剂四 (μL)	140	140	140	140	140	140	140	140
试剂五 (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20
试剂六 (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20

混匀，静置 10min，波长 570nm，酶标仪测定各管吸光度值

3、测定结果

标准品浓度 (mg/mL)	Abs	绝对 Abs
0.00	0.0080	0.0000
0.01	0.0399	0.0319
0.02	0.0752	0.0672
0.04	0.1430	0.1350
0.06	0.2117	0.2037
0.08	0.2819	0.2739
0.10	0.3530	0.3450
0.20	0.6808	0.6728

