

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°C 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°C 避光保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4°C 保存。用前加 100mL 蒸馏水充分溶解。

试剂三：液体×1 瓶，4°C 保存。

试剂四：粉剂×1 瓶，4°C 避光保存。临用前加 576 μ L 无水乙醇（自备），24 μ L 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 μ mol/mL 酚标准液，4°C 保存。

催化反应：

称取风干混匀土壤约 0.1g，加入 50 μ L 甲苯（自备），轻摇 15min；加 400 μ L 试剂一并且摇匀后，置于 37°C 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°C 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 10 μ L 蒸馏水，20 μ L 试剂三，4 μ L 试剂四，充分混匀，显色后再加蒸馏水 166 μ L，混匀后 25°C 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 10 μ L 标准液，20 μ L 试剂三，4 μ L 试剂四，充分混匀，显色后再加蒸馏水 166 μ L，混匀后 25°C 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 10 μ L 上清液，20 μ L 试剂三，4 μ L 试剂四，充分混匀，显色后再加蒸馏水 166 μ L，混匀后室温 25°C 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°C中每克土壤每天释放 1nmol 酚为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{S-NP } (\mu\text{mol/d/g 土样}) &= [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times \text{V 总} \div \text{W} \div \text{T} \\ &= 0.725 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W} \end{aligned}$$

C 标准液: 0.5 $\mu\text{mol/mL}$; 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。