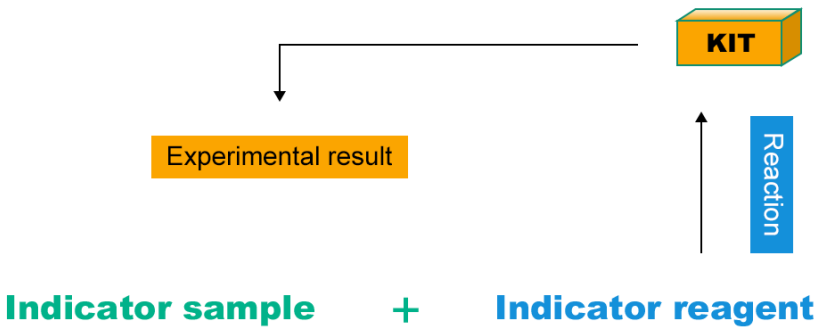
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0455 Size：100T/96S

土壤中性磷酸酶(S-NP)检测试剂盒说明书

微量法

***正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

一、测定意义：

土壤磷酸酶是一类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。土壤磷酸酶受到土壤碳、氮含量、有效磷含量和 pH 显著影响，根据最适 pH 范围，通常分为酸性、中性和碱性三种类型。

二、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 S-NP 活性。

三、需自备的仪器和用品：

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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 42mL×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 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂×1 支	4℃避光保存	临用前加 576μL 无水乙醇（自备），24 μL 蒸馏水充分溶解。（变褐色后不能再使用）
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	0.5 μmol/mL 苯酚标准液

五、操作步骤：

- 粗酶液提取：

称取风干混匀土壤约 0.1g，加入 0.05mL 甲苯（自备），轻摇 15min；加 0.4 mL 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；到时后迅速加入 1mL 试剂二充分混匀，以终止酶催化的反应。10000rpm 室温离心 10min，取上清液置于冰上待测。

- **测定步骤：**

(1) 可见分光光度计/酶标仪预热 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 μL 试剂一，40 μL 试剂三，4 μL 试剂四，充分混匀， 显色后再加蒸馏水 146μL，混匀后室温静置 30 min，于 660 nm 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 μL 标准液，40 μL 试剂三，4 μL 试剂四，充分混匀， 显色后再加蒸馏水 146μL，混匀后室温静置 30 min，于 660 nm 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 μL 上清液，40 μL 试剂三，4 μL 试剂四，充分混匀， 显色后再加蒸馏水 146μL，混匀后室温静置 30 min，于 660 nm 测定吸光度，记为 A 测定管。

注意：空白管和标准管只需要测定一次。

六、S-NP 活性计算：

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（nmol/d/g）=[C 标准液×(A 测定管－A 空白管)÷(A 标准管－A 空白管)]×V 总÷W÷T=725×(A 测定管－A 空白管)÷(A 标准管－A 空白管)÷W

C 标准液：0.5 μmol/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。

注：线性范围为 0.03125μmol/mL-3μmol/mL。