

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；到时后迅速加入 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。

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

C 标准液: 0.5μmol/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。