

## 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°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 $\mu$ L 无水乙醇（自备），24 $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ L 甲苯（自备），轻摇 15min；加 400 $\mu$ 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；到时时后迅速加入 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 $\mu$ L 蒸馏水，20 $\mu$ L 试剂三，4 $\mu$ L 试剂四，充分混匀，显色后再加蒸馏水 166 $\mu$ 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 $\mu$ L 标准液，20 $\mu$ L 试剂三，4 $\mu$ L 试剂四，充分混匀，显色后再加蒸馏水 166 $\mu$ 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 $\mu$ L 上清液，20 $\mu$ L 试剂三，4 $\mu$ L 试剂四，充分混匀，显色后再加蒸馏水 166 $\mu$ 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℃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。