

土壤中性磷酸酶 (S-NP) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TR009 微板法 96 样)

有效期: 6 个月

一、产品简介:

土壤磷酸酶对土壤磷素的有效性具有重要作用, 是评价土壤磷素生物转化方向和强度的指标, 也与土壤碳、氮含量、有效磷含量和 pH 有一定的关系。

本试剂盒提供一种简单、灵敏、快速的检测方法。在中性环境中, 土壤中性磷酸酶 (S-NP) 催化磷酸对硝基苯酯 (pNPP) 生成黄色的产物 PNP, 该产物在 405nm 处有最大吸收峰。通过检测 PNP 在 405nm 下的增加速率, 即可得到土壤中性磷酸酶活性的大小。

二、试剂盒组分与配制:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|--------------|-------|---|
| 试剂一 | 液体 100mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 粉剂 4 瓶 | 4°C保存 | 每瓶临用前甩几下使粉体落入底部, 每瓶再加 5mL 试剂一充分溶解, 一周内用完。 |
| 试剂三 | 液体 60mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 标准品 | 粉剂 1 支 | 4°C保存 | 若重新做标曲, 则用到该试剂。 |

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、恒温培养箱、天平、可调式移液器、蒸馏水、甲苯。

四、土壤中性磷酸酶 (S-NP) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

取新鲜土样或干土 (风干或者 37 度烘箱风干), 先粗研磨, 过 40 目筛网备用。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 405 nm。
- ② 在离心管中依次加入下列试剂:

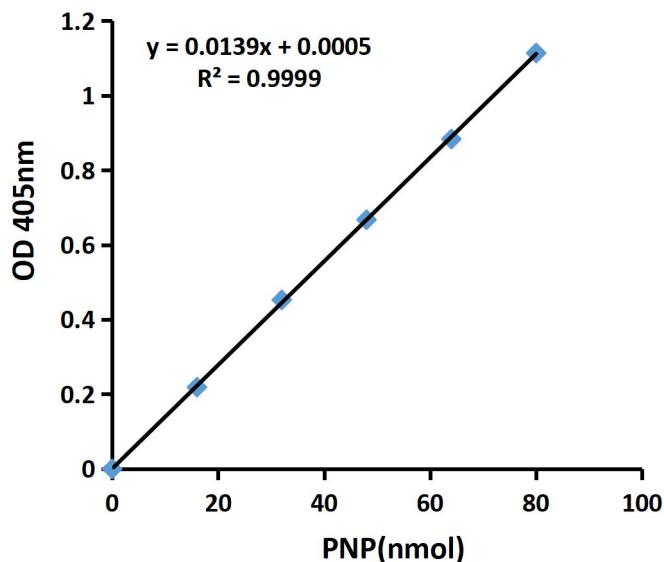
| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 | 空白管 (只做一次) |
|--|----------------------|----------------------|---------------|
| 土样 | 0.1g 鲜土或 0.05g 干土 | 0.1g 鲜土或 0.05g 干土 | |
| 甲苯 | 10 | 10 | 10 |
| 试剂一 | 290 | 490 | 290 |
| 试剂二 | 200 | | 200 |
| 混匀, 37°C (水浴锅或恒温培养箱) 振荡反应 1h | | | |
| 试剂三 | 300 | 300 | 300 |
| 混匀, 12000rpm 室温离心 10min, 取 200μL 上清液转移至 96 孔 | | | |

板中，于 405nm 下读取各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ （每个测定管需设一个对照管）。

- 【注】：1. 最后一步检测时，若有结晶析出，需要 37°C 复溶再读取吸光值。
 2. 若 ΔA 在零附近徘徊，可延长 37°C 的孵育时间 T（如增至 4 小时或更长），或增加土样质量 W（如增至 0.2g）。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。
 3. 若测定管 A 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1.5，可缩短 37°C 的孵育时间 T（如减至 0.5 小时或更短）。则改变后 T 需代入计算公式重新计算。或对最后一步的待检测上清液（包括测定管、对照管和空白管）同时用蒸馏水进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。
 4. 若同时检测一大批同一背景下土壤样本（如都是黄土，黑土，红土，黄土等），可做三次样本自身对照管（取平均值作为这批土壤样本的对照管），可从称样到检测步骤节省检测时间。

五、结果计算：

- 1、标准曲线： $y = 0.0139x + 0.0005$ ；x 是 PNP 摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



- 2、定义：每克土壤每小时水解 PNPP 产生 1nmol 对硝基苯酚（PNP）为一个酶活单位。

$$S\text{-NP}(\text{nmol/h/g 土样}) = [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0139] \div W \div T \times D = 71.9 \times (\Delta A - 0.0005) \div W \times D$$

W---土壤样品质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

T---催化反应时间，1h；

PNP 相对分子质量---139.11。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（10 $\mu\text{mol/mL}$ ）：向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解，若有结晶析出，需 37°C 水浴至完全溶解。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管中直接加入：10 μL 标准品+490 μL 试剂一+300 μL 试剂三，混匀，取 200 μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。

