

## 土壤酸性磷酸酶 (S-ACP) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TR008-48 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

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。在酸性环境中, 土壤酸性磷酸酶 (S-ACP) 催化磷酸对硝基苯酯 (PNPP) 生成黄色对硝基苯酚 (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 S-ACP 酶活性大小。

### 二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 2 瓶	4°C 避光保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 5mL 试剂一充分溶解, 现配现用, 一周内用完。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C 避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

### 三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、甲苯、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

## 1、样本提取：

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、检测步骤：

- 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：

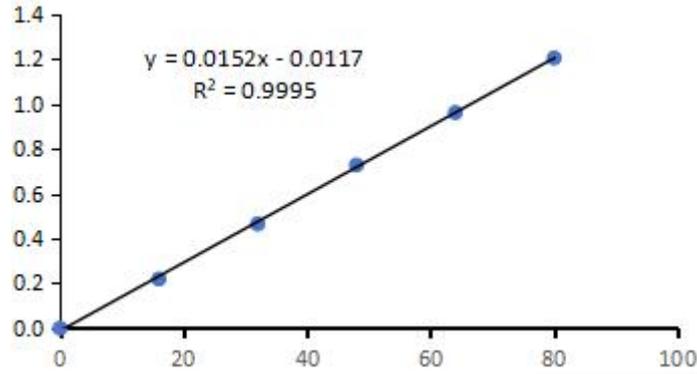
试剂组分 (μL)	测定管	对照管	空白管 (只做一次)
土样	0.1g 鲜土或 0.05g 干土	0.1g 鲜土或 0.05g 干土	
甲苯	10	10	10
试剂一	290	490	290
试剂二	200		200
混匀，37°C（水浴锅或恒温培养箱）振荡反应 1h			
试剂三	300	300	300
混匀，12000rpm 室温离心 10min，取 200μL 上清液至 96 孔板中，于 405nm 下读取各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ （每个测定管需设一个对照管）。			

### 【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  $\Delta A$  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  $\Delta A$  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）。
4. 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
5. 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。
6. 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： $y = 0.0152x - 0.0117$ ；x 是 PNP 摩尔质量 (nmol)，y 是  $\Delta A$ 。



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。

$$S\text{-ACP}(\text{nmol/h/g 土样})=[(\Delta A+0.0117)\div 0.0152]\div W\div T\times D=65.79\times(\Delta A+0.0117)\div W\times D$$

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

W---土壤样品质量，g；

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. 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。标准品母液浓度为 10μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8 μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2. 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 800uL，加入 200uL 蒸馏水，混匀得到 8μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	1.6	3.2	4.8	6.4	8
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3. 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
蒸馏水		10
试剂一	490	490
试剂三	300	300
混匀，取出 200μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		