

土壤酸性磷酸酶（S-ACP）活性测定试剂盒说明书

(货号: G0304F 分光法 48 样)

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 55mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×2 瓶	4℃保存	每瓶临用前甩几下使粉体落入底部,每瓶再加 5.5mL 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℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、台式离心机、恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、蒸馏水、甲苯。

四、土壤酸性磷酸酶（S-ACP）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 分光光度计预热 30min 以上,调节波长到 405nm,蒸馏水调零。

② 在离心管中依次加入下列试剂:

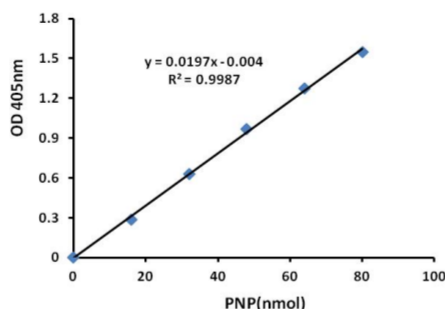
试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (只做一次)
土样	0.1g 鲜土或 0.05g 干土	0.1g 鲜土或 0.05g 干土	
甲苯	10	10	10
试剂一	290	490	290
试剂二	200		200
混匀, 37℃(水浴锅或恒温培养箱)振荡反应 1h			
试剂三	300	300	300
混匀, 12000rpm 室温离心 10min, 上清液全部转移至 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中,于 405nm 下读取各管吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ (每个测定管需设一个对照管)。			

【注】: 1.最后一步检测时,若有结晶析出,需要 37℃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： $y = 0.0197x - 0.004$ ；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。

$$S-ACP(nmol/h/g \text{ 土样}) = [(\Delta A + 0.0004) \div 0.0197] \div W \div T \times D = 50.8 \times (\Delta A + 0.0004) \div W \times D$$

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 制备标准品母液（10 μ 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 μ 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 μ L 标准品+490 μ L 试剂一+300 μ L 试剂三，混匀，取出全部上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。