

## 土壤中中性磷酸酶（S-NP）试剂盒说明书

(货号: G0306W 微板法 96 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。在中性环境中,土壤中中性磷酸酶(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℃保存 |                                           |
| 试剂二  | 粉剂 mg×4 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,一周内用完。 |
| 试剂三  | 液体 60mL×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:

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 30min 以上,调节波长到 405nm。

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<br>(只做一次) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| 土样                                                                                                                                             | 0.1g 鲜土或<br>0.05g 干土 | 0.1g 鲜土或<br>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, 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℃复溶再读取吸光值。

2. 若  $\Delta A$  在零附近徘徊, 可延长 37℃的孵育时间 T (如增至 4 小时或更长), 或增加

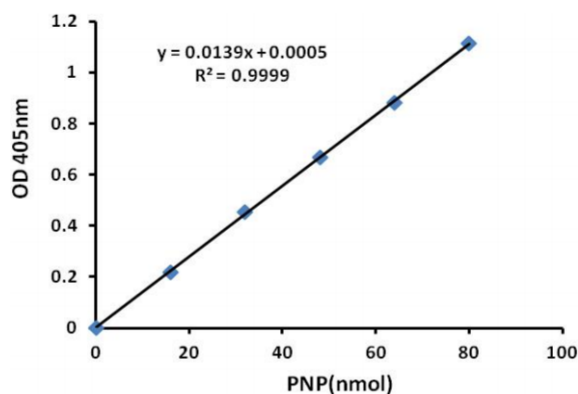
土样质量 W (如增至 0.2g)。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

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)。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  $\Delta A$ 。



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

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 $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ L 标准品+490 $\mu$ L 试剂一+300 $\mu$ L 试剂三, 混匀, 取 200 $\mu$ L 至 96 孔板中, 于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。