土壤酸性磷酸酶（S-ACP）活性测定试剂盒说明书

(货号：G0304W 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 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，现配现用，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、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：

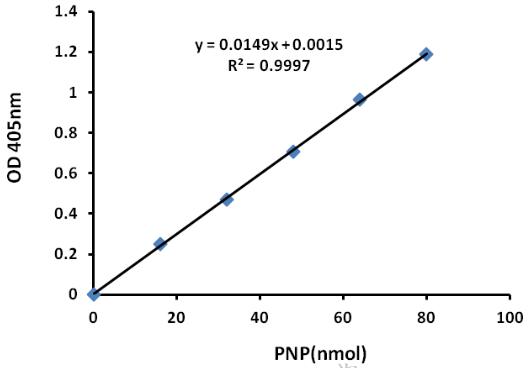
① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 405nm。

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（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，取 200μL 上清液至 96 孔板中，于 405nm 下读取各管吸光值 A，△A=A 测定-A 对照-A 空白（每个测定管需设一个对照管）。			

五、结果计算：

1、标准曲线：y = 0.0149x + 0.0015；x 是 PNP 摩尔质量（nmol），y 是△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-ACP(nmol/h/g 土样)=[(△A-0.0015)÷0.0149]÷W÷T×D=67.1×(△A-0.0015)÷W×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（10μmol/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℃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 μmol/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：10μL 标准品+490μL 试剂一+300μL 试剂三，混匀，取出 200μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值。

4　根据结果制作标准曲线。