

土壤中性磷酸酶（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 mg×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 5.5mL 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 mg×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。

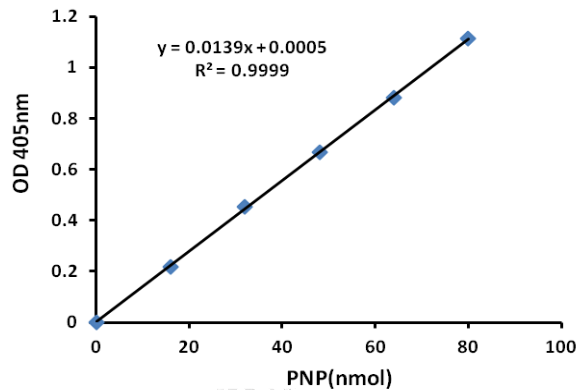
2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 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°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 200 μL 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）。			

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 $^{\circ}\text{C}$ 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。