

土壤中性磷酸酶（S-NP）试剂盒说明书

（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 55mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×2 瓶	4°C保存	每瓶临用前甩几下使粉体落入底部，每瓶再加 5mL 试剂一充分溶解，一周内用完。
试剂三	液体 30mL×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：

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 分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 405 nm，蒸馏水调零。

② 在离心管中依次加入下列试剂：

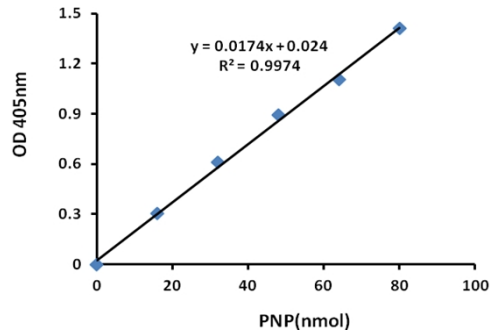
试剂名称（ μL ）	测定管	对照管	空白管 （只做一次）
土样	0.1g 鲜土或 0.05g 干土	0.1g 鲜土或 0.05g 干土	
甲苯	10	10	10
试剂一	290	490	290
试剂二	200		200
混匀，37°C（水浴锅或恒温培养箱）振荡反应 1h			
试剂三	300	300	300
混匀，12000rpm 室温离心 10min，上清液全部转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 下读取各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ （每个测定管需设一个对照管）。			

【注】：1.最后一步检测时，若有结晶析出，需要 37°C 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: $y = 0.0174x + 0.024$; 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。
 $S-NP(\text{nmol/h/g 土样}) = [(\Delta A - 0.024) \div 0.0174] \div W \div T \times D = 57.5 \times (\Delta A - 0.024) \div W \times D$

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°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 1mL 玻璃比色皿中直接加入: 10 μL 标准品+490 μL 试剂一+300 μL 试剂三, 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。