

土壤中中性磷酸酶（S-NP）试剂盒说明书

(货号：ADS-W-TR009-48 微板法 48 样 有效期：6 个月)

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 2 瓶	4℃避光保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 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 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、甲苯、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以免造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 405 nm。
- ② 在离心管中依次加入下列试剂：

试剂组分（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。

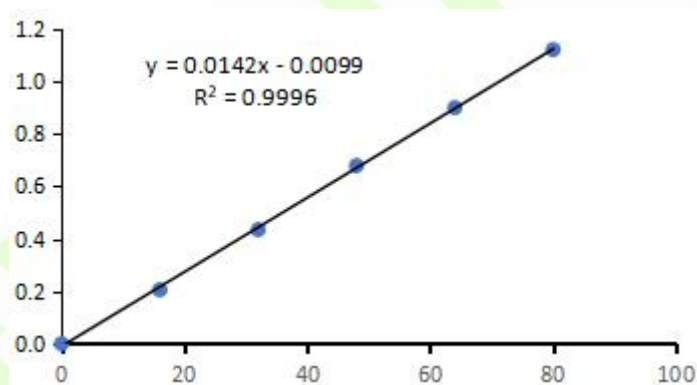
2.若 ΔA 在零附近徘徊，可延长 37℃的孵育时间 T（如增至 4 小时或更长），或增加土样质量 W（如增至 0.2g）。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

3.若测定管 A 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1.5，可缩短 37℃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： $y = 0.0142x - 0.0099$ ；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。

$$S\text{-NP}(\text{nmol/h/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0099) \div 0.0142] \div W \div T \times D = 70.4 \times (\Delta A + 0.0099) \div W \times D$$

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 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。标准品母液浓度为 10μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8 μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 800uL，加入 200uL 蒸馏水，混匀得到 8μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	1.6	3.2	4.8	6.4	8
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200

水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
蒸馏水		10
试剂一	490	490
试剂三	300	300
混匀，取 200μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		