

土壤酸性磷酸酶（S-ACP）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

土壤磷酸酶是一类催化土壤有机磷矿化的酶，其活性的高低直接影响着土壤中有机磷的分解转化及其生物有效性，是评价土壤磷素生物转化方向与强度的指标。土壤磷酸酶受到土壤碳、氮含量、有效磷含量和 pH 显著影响，根据最适 pH 范围，通常分为酸性、中性和碱性三种类型。

测定原理：

酸性环境中，S-ACP 催化磷酸苯二钠水解生成苯酚和磷酸氢二钠，通过测定酚的生成量即可计算出 S-ACP 活性。

自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、台式离心机、37℃ 恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、冰、蒸馏水、乙醇和甲苯。

试剂组成和配制：

试剂一：液体×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。用前加 100mL 蒸馏水充分溶解。

试剂三：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加 576 μ L 无水乙醇（自备），24 μ L 蒸馏水充分溶解。（变褐色后不能再使用）

标准品：液体×1 瓶，0.5 μ mol/mL 苯酚标准液，4℃ 保存。

粗酶液提取：

称取风干混匀土壤约 0.1g，加入 50 μ L 甲苯（自备），轻摇 15min；加 0.4 mL 试剂一并且摇匀后，置于 37℃ 恒温培养箱，开始计时，催化反应 24h；到时时迅速加入 1mL 试剂二充分混匀，以终止酶催化的反应。8000g，25℃ 离心 10min，取上清液置于冰上待测。

测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 660 nm，蒸馏水调零。
2. 空白管：取微量玻璃比色皿/酶标板，加入 10 μ L 蒸馏水，20 μ L 试剂三，4 μ L 试剂四，充分混匀，显色后再加蒸馏水 166 μ L，混匀后 25℃ 静置 30 min，于 660 nm 测定吸光度，记为 A 空白管。
3. 标准管：取微量玻璃比色皿/酶标板，加入 10 μ L 标准液，20 μ L 试剂三，4 μ L 试剂四，充分混匀，显色后再加蒸馏水 166 μ L，混匀后 25℃ 静置 30 min，于 660 nm 测定吸光度，记为 A 标准管。
4. 测定管：取微量玻璃比色皿/酶标板，加入 10 μ L 上清液，20 μ L 试剂三，4 μ L 试剂四，充分混匀，显色后再加蒸馏水 166 μ L，混匀后 25℃ 静置 30 min，于 660 nm 测定吸光度，记为 A 测定管。

注意：空白管和标准管只需测定一次。

S-ACP 活性计算公式：

活性单位定义：37℃中每克土壤每天释放 1μmol 酚为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{S-ACP } (\mu\text{mol/d/g 土样}) &= [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times V_{\text{总}} \div W \div T \\ &= 0.725 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div W \end{aligned}$$

C 标准液 0.5 μmol/mL； V 总：催化体系总体积，1.45mL； W：土壤样品质量，g； T：催化反应时间，24h=1 d。