

## 土壤酸性磷酸酶（S-ACP）检测试剂盒（微量法）

**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。

### 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 μL 无水乙醇（自备），24 μL 蒸馏水充分溶解。

（变褐色后不能再使用）

标准品：液体×1 瓶，0.5μmol/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 50μL 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；到时时后迅速加入 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 $\mu$ L 蒸馏水, 20 $\mu$ L 试剂三, 4 $\mu$ L 试剂四, 充分混匀, 显色后再加蒸馏水 166 $\mu$ L, 混匀后 25 $^{\circ}$ C 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 $\mu$ L 标准液, 20 $\mu$ L 试剂三, 4 $\mu$ L 试剂四, 充分混匀, 显色后再加蒸馏水 166 $\mu$ L, 混匀后 25 $^{\circ}$ C 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 $\mu$ L 上清液, 20 $\mu$ L 试剂三, 4 $\mu$ L 试剂四, 充分混匀, 显色后再加蒸馏水 166 $\mu$ L, 混匀后 25 $^{\circ}$ C 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:

性单位定义: 37 $^{\circ}$ C 中每克土壤每天释放 1 $\mu$ mol 酚为 1 个酶活单位。

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

C 标准液: 0.5  $\mu$ mol/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。