

土壤酸性磷酸酶活性测定试剂盒说明书

荧光法 100 管/96 样

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：

4-羟甲基-7-香豆素(MUB)在 365 nm 波长处激发，能在 470 nm 处检测到荧光，它与某些物质结合后荧光特性消失，通过酶的水解作用 MUB 释放出来，通过检测荧光量来表征酶活性。

自备仪器和用品：

多功能酶标仪、恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、冰、蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 120mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。用前加 11 mL 蒸馏水充分溶解。

试剂三：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

粗酶液提取：

新鲜土样自然风干或 37℃ 烘箱风干，过 30~50 目筛。按照土壤质量 (g)：试剂一 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 土壤，加入 1mL 试剂一），振荡混匀。

测定步骤：

1. 测定管：在震荡条件下取 100 μL 土壤悬液到 EP 管中，加入 100 μL 试剂二，30℃ 震荡避光培养 3 h，从中吸取 134 μL 到黑色不透光 96 孔板中，加入 66 μL 试剂三后用多功能酶标仪进行检测，激发光波长 365 nm，测定波长 470nm。

2. 对照管：取 100 μL 蒸馏水到 EP 管中，加入 100 μL 试剂二，30℃ 震荡避光培养 3 h，从中吸取 134 μL 到黑色不透光 96 孔板中，加入 66 μL 试剂三后用多功能酶标仪进行检测，激发光波长 365 nm，测定波长 470nm。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$

注意：对照管只需测定一次。

土壤酸性磷酸酶活性计算公式：

标准曲线： $y = 62629x - 2266.4$ $R^2 = 0.9996$ x: MUB 标准品浓度 (nmol/mL)

y: 荧光强度

$$\begin{aligned} \text{酶活 (nmol/h/g 土样)} &= (\Delta A + 2266.4) \div 62629 \times V \div T \div W \\ &= (\Delta A + 2266.4) \div 187887 \div W \end{aligned}$$

V: 提取液体积，1 mL； W: 土壤样品质量，g； T: 催化反应时间，3 h。