

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、研钵、30-50 目筛、甲苯、浓硫酸、1mL 玻璃比色皿、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

新鲜土样自然风干或 37°C烘箱风干，过 30~50 目筛。

二、测定步骤

1、可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 700nm，用蒸馏水调零。

2、标准溶液的稀释：将10 μ mol/mL无机磷标准液用蒸馏水稀释至1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125、0.039、0.02、0.01、0.005 μ mol/mL备用。

3、标准溶液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 (μ mol/mL)	标准液体积 (μ L)	蒸馏水体积 (μ L)	稀释后浓度 (μ mol/mL)
1	10	200	1400	1.25
2	1.25	700	700	0.625
3	0.625	700	700	0.3125
4	0.3125	700	700	0.15625
5	0.15625	700	700	0.078125
6	0.078125	700	700	0.039
7	0.039	700	700	0.02
8	0.02	700	700	0.01
9	0.01	700	700	0.005

备注：实验中每个标准管需 500 μ L 标准溶液。

4、在 EP 管中按下表步骤加样：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
土样(g)	0.05	0.05	-	-
试剂一(μ L)	35	35	-	-
振荡，用试剂一将土样浸湿（潮湿状态即可），室温放置 15min			-	-
试剂二(μ L)	835	-	-	-
混匀，37°C水浴/恒温培养 24h，沸水浴 10min			-	-
试剂二(μ L)	-	835	-	-
10000g，25°C离心 5min，取上清			-	-
标准液(μ L)	-	-	500	-
蒸馏水(μ L)	-	-	-	500
上清液(μ L)	500	500	-	-
工作液(μ L)	500	500	500	500

常温静置 15min，于 700nm 处测定吸光值，分别记为 A 测定、A 对照、A 标准、A 空白。分别计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白（标准曲线和空白管只需做 1-2 次，每个测定管需设置一个对照管）。

三、土壤植酸酶活性的计算

1. 标准曲线的绘制

根据标准管的浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）和吸光度 ΔA 标准（y， ΔA 标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 测定（y， ΔA 测定）代入公式计算样本浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）。

2. 土壤植酸酶活性计算

单位定义：37°C 下每 g 土壤每天在反应体系释放 $1\mu\text{mol}$ 无机磷为 1 个酶活力单位。

土壤植酸酶活性（U/g）= $x \times V \text{ 反总} \div W \div T = 0.87x \div W$

V 反：反应体系总体积，0.87mL；W：土壤质量，g；T：反应时间，24h=1d。

注意事项：

1. 为防止沸水浴 10min 过程中水分散失，建议使用螺旋盖的离心管或用封口膜给 EP 管缠口。
2. 如果 ΔA 测定 < 0.01，适当延长第一步 37°C 反应时间或加大样本量后，重新测定。如果 ΔA 测定 > 1.2，建议将上清液用蒸馏水适当稀释后进行测定，注意乘以稀释倍数。
3. 结果于 30min 内测定完毕，尽量保证所有样本测定时间的一致性。

实验实例：

1. 取 0.05g 林土，按照测定步骤操作，在玻璃比色皿中测得 A 测定 = 1.187，A 对照 = 0.776， ΔA 测定 = 0.411，将 ΔA 测定代入标曲公式 $y = 1.7046x + 0.0063$ ，得出 $x = 0.2374$ ，按样本质量计算酶活得：
土壤植酸酶活性（U/g）= 4.13U/g。
2. 取 0.05g 蘑菇地土壤，按照测定步骤操作，测得 A 测定 = 0.756，A 对照 = 0.577， ΔA 测定 = 0.179，将 ΔA 测定代入标曲公式 $y = 1.7046x + 0.0063$ ，得出 $x = 0.1013$ ，按样本质量计算酶活得：
土壤植酸酶活性（U/g）= 1.763 U/g。

参考文献：

- [1] Berry D F, Shang C, Zelazny L W. Measurement of phytase activity in soil using a chromophoric tethered phytic acid probe[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2009, 41(2):192-200.
- [2] Marshall, Arebojie, Azeke, et al. Effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of rice (Oryza sativa), maize (Zea mays), millet (Panicum miliaceum), sorghum (Sorghum bicolor) and wheat (Triticum aestivum) [J]. Journal of Food Science & Technology, 2011, 48(6):724-729.

相关系列产品：

- BC0140/BC0145 土壤酸性磷酸酶（S-ACP）活性检测试剂盒
- BC0460/BC0465 土壤中性磷酸酶（S-NP）活性检测试剂盒
- BC0280/BC0285 土壤碱性磷酸酶（S-AKP/ALP）活性检测试剂盒
- BC0270/BC0275 土壤中性蛋白酶活性检测试剂盒
- BC0390/BC0395 土壤脱氢酶（S-DHA）活性检测试剂盒