

## 土壤碱性磷酸酶（S-ALP）活性测定试剂盒说明书

(货号：ADS-F-TR010 分光法 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。在碱性环境中，土壤碱性磷酸酶（S-ALP）催化磷酸对硝基苯酯（PNPP）生成黄色对硝基苯酚（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 S-ALP 酶活性大小。

### 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 55mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                                  |
| 试剂二  | 粉剂 2 瓶      | 4℃避光保存 | 每瓶：<br>1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>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；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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，以防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 分光光度计预热 30 min，调节波长到 405 nm，蒸馏水调零。

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<br>（只做一次） |
|--------------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| 土样                       | 0.1g 鲜土或<br>0.05g 干土 | 0.1g 鲜土或<br>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，上清液全部转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）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°C 复溶再读取吸光值。

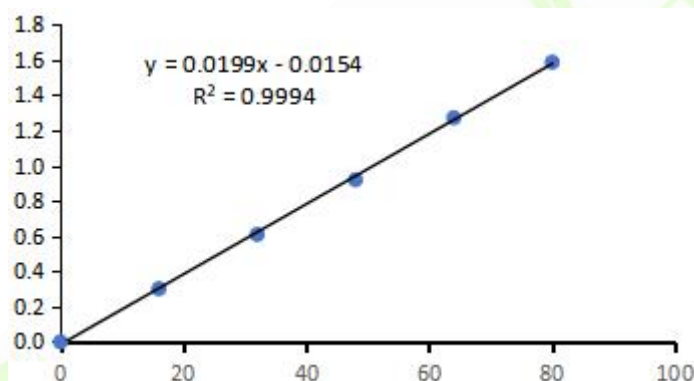
2. 若  $\Delta A$  在零附近徘徊，可延长 37°C 的孵育时间 T（如增至 4 小时或更长），或增加土样质量 W（如增至 0.2g）。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

3. 若测定管 A 值大于 1.5 或  $\Delta A$  大于 1.5，可缩短 37°C 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： $y = 0.0199x - 0.0154$ ；x 是 PNP 摩尔质量（nmol），y 是  $\Delta A$ 。



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。

$$S\text{-ALP}(\text{nmol/h/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0154) \div 0.0199] \div W \div T \times D = 50.3 \times (\Delta A + 0.0154) \div W \times D$$

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，1 h；

PNP 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°C 水浴至完全溶解。标准品母液浓度为 10 $\mu\text{mol/mL}$ 。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  $\mu\text{mol/mL}$ 。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 8 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品浓度<br>$\mu\text{mol/mL}$                                     | 0   | 1.6 | 3.2 | 4.8 | 6.4 | 8   |
| 标品稀释液<br>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，取出全部上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。 |     |              |