

土壤碱性磷酸酶 (soil alkaline phosphatase, S-AKP/ALP) 活性测定

试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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化合物矿化的酶,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。通常按照其最适 pH 范围,分为碱性、中性和酸性三种类型磷酸酶。

测定原理：

碱性环境中, S-AKP/ALP 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-AKP/ALP 活性。

自备仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、37℃恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、冰、蒸馏水、无水乙醇和甲苯。

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 60mL 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 1152μL 无水乙醇 (自备), 48 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。

催化反应：

称取风干混匀土壤约 0.1g, 加入 50μL 甲苯 (自备), 轻摇 15min; 加 400μL 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。

显色反应：

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 660 nm, 蒸馏水调零。

2. 空白管：取 1mL 玻璃比色皿, 加入 50 μL 蒸馏水, 100 μL 试剂三, 20 μL 试剂四, 充分混匀, 显色后再加蒸馏水 830 μL, 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 1mL 玻璃比色皿, 加入 50 μL 标准液, 100 μL 试剂三, 20 μL 试剂四, 充分混匀, 显色后再加蒸馏水 830 μL, 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 1mL 玻璃比色皿, 加入 50 μL 上清液, 100 μL 试剂三, 20 μL 试剂四, 充分混匀, 显色后再加蒸馏水 830 μL, 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-ALP 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。

S-AKP/ALP (μmol/d/g 土样)=[C 标准液×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)]×V

$$\text{总} \div \text{W} \div \text{T}$$

$$= 0.725 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W}$$

C 标准液: 0.5 $\mu\text{mol/mL}$; 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, 24 h=1 d。