

土壤碱性磷酸酶 (S-AKP/ALP) 活性检测试剂盒 (微量法)
(本试剂盒仅供科研使用)**产品包装**

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0117	土壤碱性磷酸酶 (S-AKP/ALP) 活性检测试剂盒	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 × 1 瓶	4℃, 避光
试剂二	粉剂 × 1 瓶: 临用前每瓶加入 100mL 蒸馏水充分溶解。	4℃
试剂三	液体 × 1 瓶	4℃
试剂四	粉剂 × 1 瓶: 临用前每瓶加入 576μL 无水乙醇 (自备)、24μL 蒸馏水充分溶解。(溶液变褐色后不能使用)	4℃, 避光
标准品	液体 × 1 瓶: 0.5μmol/mL 苯酚标准液。	4℃

一、产品说明

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。

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,通过苯酚与 2,6-二溴苯醌氯亚胺在碱性条件下显色,于 660nm 波长测定显色产物吸光度并结合苯酚标准品定量酚的生成量,即可计算出 S-AKP/ALP 活性。

二、自备材料

酶标仪、台式离心机、37℃ 恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、96 孔板、冰、蒸馏水、无水乙醇、甲苯。

三、样品制备

- 新鲜土样自然风干或 37℃ 烘箱风干,过 30~50 目筛。
- 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,终止酶催化的反应。8000g, 25℃ 离心 10min,取上清液置于冰上待测。

四、操作步骤

正式测定前,必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 660nm,蒸馏水调零。
- 操作表:

试剂名称 (μL)	空白管	标准管	测定管
蒸馏水	10		
标准品		10	

上清液			10
试剂三	20	20	20
试剂四	4	4	4
充分混匀, 显色后再加蒸馏水 166 μ L, 混匀后 25 $^{\circ}$ C 静置 30 min, 于 660 nm 测定吸光度, 空白管和标准管只需测定一次。			

五、S-AKP/ALP 活性的计算

单位的定义: 37 $^{\circ}$ C 每天每 g 土壤释放 1 μ mol 酚为一个酶活力单位。

计算公式:

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

C 标准液: 0.5 μ 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。

六、注意事项

- 1、本法中, ΔA 的范围为 0.01~1.0, 若小于 0.01, 可增加样本质量或适当延长反应时间; 若大于 1.0, 高于可使用蒸馏水对上清液进行稀释, 最终计算结果需同步修改。
- 2、当上清液中苯酚生成浓度高于 1 mM 时, 需对上清液进行适当稀释; 若浓度过高, 显色反应将无法完全进行, 导致蓝色变浅甚至不显色, 影响定量准确性。

常见问题及解决方案:

问题	可能原因	解决方法
样品读数重复性差	样品类型不合适	参考说明书了解不兼容的样品类型
	组织样品匀浆不充分	延长超声时间/增加匀浆器的研磨次数
	样品反复冻融次数过多	将样品分装, 不可反复冻融
	样品中含有干扰物质	排查干扰物质, 必要时对样品进行脱蛋白处理
	样品读数超出线性范围	对样品进行浓缩或稀释, 使读数处于线性范围内
	孔中有气泡	气泡会干扰读数, 操作时尽量避免产生气泡, 读数前务必去除气泡
样品和标准品读数偏低/偏高	样品放置时间过长或储存不当	使用新鲜制备的样品, 按推荐温度保存至使用前
	试剂盒组分未完全解冻	待组分完全解冻后轻轻混匀再使用
	试剂在冰上放置时间过长	每次使用前新鲜配制反应混合液
	孵育时间/温度不当	参考说明书推荐的孵育时间和/或温度
	试剂加样量错误	检查移液枪是否校准 (始终使用能吸取整体积的最小量程移液枪); 尽量避免吸取过小体积的试剂
	配制反应混合液时移液误差	始终配制混合母液