

土壤芳基酰胺酶活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10086F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

土壤芳基酰胺酶 (Aryl-acylamidase, EC 3.5.1.13) 可水解带有酰胺基团的化合物; 本试剂盒利用土壤芳基酰胺酶水解底物 L-亮氨酸 β -萘胺生成 β -萘胺, β -萘胺接着与对二甲氨基肉桂醛生成红色偶氮化合物, 该化合物于 540nm 处有特征吸收峰, 通过检测该红色物质的增加速率, 即可计算土壤芳基酰胺酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 6mL 蒸馏水, 充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 15mL 乙醇, 充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
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; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 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、无水乙醇、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样本情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本提取:

取新鲜土样风干或者 30℃烘箱风干, 先粗研磨, 过 40 目筛, 备用。

【注】: 土壤风干, 减少土壤中水分对于实验的干扰; 土壤过筛, 保证取样的均匀细腻;

2、检测步骤:

① 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μ L)	测定管	对照管
样本	0.1g 土壤	0.1g 土壤
试剂一	300	300
试剂二	100	
混匀, 于 37℃孵育 2h (间隔 30min 振荡混匀一次)		
95%乙醇	600	600
试剂二		100

立即混匀, 于 12000rpm, 室温或 4℃离心 10min, 离心 10min, 上清液待测。

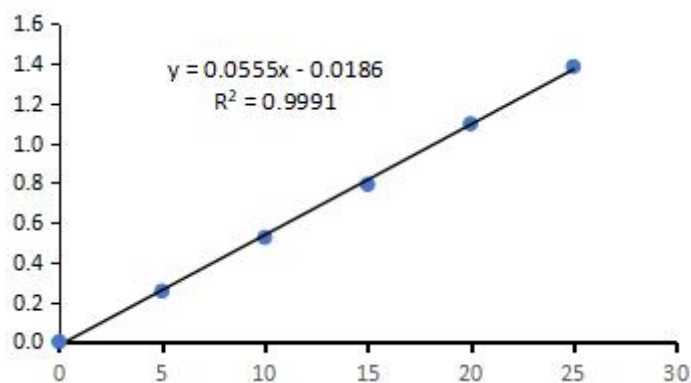
③ 显色反应, 在 EP 管中依次加入:

上清液	280	280
试剂三	280	280
试剂四	280	280
混匀, 10min 后, 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 540nm 处测定吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定 - A 对照 (每个样本做一个自身对照)。		

【注】: 1. 若 ΔA 值在零附近徘徊, 可在 37℃孵育阶段延长反应时间 T (如增至 3h 或更长), 或增加土壤样本量 W (如增至 0.2g), 则改变后的反应时间 T 和 W 需代入公式重新计算。 2. 若 A 测定的值大于 1.8, 可用乙醇对整个红色显色反应液进行稀释, 则稀释倍数 D 需代入公式参与计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0555x - 0.0186$, x 是标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$), y 是 ΔA 。



2、酶活定义: 37℃条件下, 每克土样每小时释放出 $1\mu\text{g}$ 的 β -萘胺为一个酶活力单位。

$$\text{土壤芳基酰胺酶活性}(\mu\text{g/h/g 土样}) = (\Delta A + 0.0186) \div 0.0555 \times V1 \div W \div T \\ = 9 \times (\Delta A + 0.0186) \div W$$

V1---孵育阶段的反应总体积, 1mL; T---反应时间, 2h; W---样本质量, g;

附: 标准曲线制作过程:

- 标准品用 1mL 乙醇溶解。(母液需在两天内用), 标准品母液浓度为 2.5mg/mL 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 5, 10, 15, 20, 25. $\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 标品稀释参照表如下:

1. 吸取标准品母液 100uL, 加入 900uL 蒸馏水, 混匀得到 $250\mu\text{g/mL}$ 的标品稀释液;						
2. 吸取 $250\mu\text{g/mL}$ 的标品稀释液 200uL, 加入 1800uL 蒸馏水, 混匀得到 $25\mu\text{g/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{g/mL}$	0	5	10	15	20	25
标品稀释液 uL	0	80	160	240	320	400

水 uL	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，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	280	
蒸馏水		280
试剂三	280	280
试剂四	280	280
混匀，10min 后，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 540nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		