

土壤淀粉酶（Soil Amylase, S-AL）试剂盒说明书

（货号：BP10113F 分光法 24 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

土壤中的淀粉酶主要来自于微生物，是一种重要的酶制剂。淀粉酶可水解淀粉产生还原糖，本试剂盒采用 3,5-二硝基水杨酸与终产物还原糖反应生成棕红色物质，在 540nm 处有特征吸收峰，进而得到土壤淀粉酶活性。

二、测试盒组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉体 1 瓶	4℃保存	1. 临用前加入 30ml 试剂二,可 80℃水浴, 搅拌至溶解, 待用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃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、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、样本处理：

取新鲜土样或风干土壤，先粗研磨，过 40 目筛网，待测备用。

【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 培养：在 EP 管依次加入：

试剂 (μL)	测定管	对照管
土样 (g)	0.1	0.1
甲苯	40	40
25℃静置 15min		
试剂一	1000	
试剂二		1000
充分混匀，37℃培养 1h，12000rpm，25℃离心 10min，上清液待用		

② 分光光度计预热 30min 以上，调节波长为 540nm，蒸馏水调零。

③ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

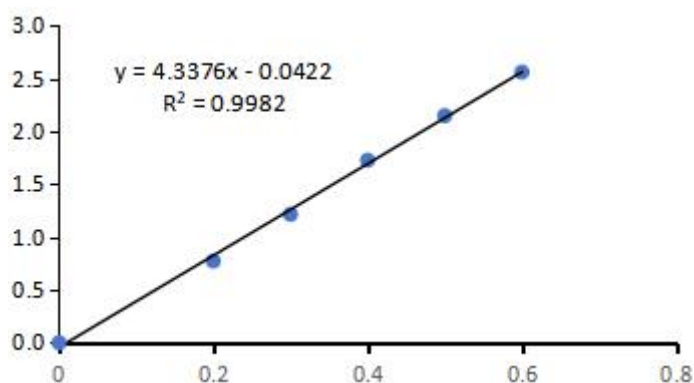
上清液	600	600
试剂三	300	300

混匀, 95℃水浴 5min, 待冷却后, 全部转移到 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 在 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

【注】若 ΔA 在零附近徘徊, 可增加土样质量 (如增至 0.2g), 或延长培养时间 (如增至 3h 或更长), 则改变后的土样质量和反应时间 T 代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 4.3376x - 0.0422$; x 为标准品质量 (mg/mL), y 为 ΔA 。



2、酶活单位定义: 每克土样每小时催化生成 1μg 葡萄糖为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} S\text{-AL}(\mu\text{g/h/g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0422) \div 4.3376 \times 10^3 \times V] \div W \div T \\ &= 239.8 \times (\Delta A + 0.0422) \div W \end{aligned}$$

V---反应总体积: 1040μL=1.04mL;

T---反应时间, 1h;

W---土壤样本实际取样量, g;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中, 再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的葡萄糖 (母液需在两天内用且 -20℃保存)。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6mg/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 1200uL, 加入 800uL 蒸馏水, 混匀得到 0.6mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
标品稀释液 uL	0	120	240	360	480	600
水 uL	600	480	360	240	120	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	600	
蒸馏水		600

试剂三	300	300
混匀，95℃水浴 5min，待冷却后，全部转移到 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，在 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		