

土壤酸性转化酶 (S-AI) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10549

规格: 100T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入 10 mL 试剂一充分溶解备用, 用不完的试剂 4°C保存;
- 2、标准品: 10 mg 无水葡萄糖, 临用前加入 1 mL 试剂一充分溶解, 制备 10 mg/mL 葡萄糖标准溶液待用。

产品说明:

S-AI 在 pH 为 4.5~5.0 (酸性) 条件下催化蔗糖不可逆地分解为果糖和葡萄糖, 是土壤微生物蔗糖代谢关键酶之一。S-AI 催化蔗糖降解产生还原糖, 进一步与 3,5-二硝基水杨酸反应, 生成棕红色氨基化合物, 在 540nm 有特征光吸收, 在一定范围内 540nm 光吸收增加速率与 S- AI 活性成正比。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰、蒸馏水、30-50 目筛、甲苯。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可参考文献)

新鲜土样自然风干或 37°C烘箱风干, 过 30~50 目筛。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热30min以上, 调节波长至540nm, 蒸馏水调零。
- 2、标准液的稀释: 将10mg/mL葡萄糖标准液用试剂一稀释至0.4、0.3、0.2、0.1、0.08、0.06 mg/mL的葡萄糖标准液备用。
- 3、样本测定:

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
风干土样 (g)	0.02	0.02	-	-
试剂一 (μL)	-	160	-	160
试剂二 (μL)	160	-	-	-
标准液 (μL)	-	-	160	-

甲苯 (μL)	4	4	4	4
混匀, 37°C准确水浴1h后, 煮沸10min左右(盖紧, 以防止水分散失), 流水或冰浴冷却后充分混匀(以保证浓度不变), 10000rpm, 常温离心10min, 取上清。				
上清 (μL)	140	140	140	140
试剂三 (μL)	60	60	60	60

混匀, 煮沸 10min 左右 (盖紧, 以防止水分流失), 流水冷却后充分混匀, 540nm 处蒸馏水调零, 记录各管吸光值 A, 记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

三、S-AI 活性计算

1、标准曲线的绘制:

以葡萄糖浓度为 x 轴, 相应的 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y = kx + b$; 将 ΔA 带入公式得到 x (mg/mL)。

2、S-AI 活性计算

单位定义: 37°C 每 g 土壤每天产生 1mg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$S-AI \text{ (U/g 土样)} = x \times V \div W \div T = 3.84 \times x \div W$$

V: 加入的标准液体积, 0.16mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间: 1/24d。

注意事项:

- 1、如果加入试剂三, 煮沸 10min 后有混浊物出现, 建议离心除去沉淀 (10000rpm, 2min), 取上清测定吸光度
- 2、如果吸光值大于 1, 可以将上清液再进行稀释; 若吸光值较小, 可以减少上清液稀释倍数。两种操作均要注意改变公式中的稀释倍数。

实验实例:

- 1、取两管 0.02g 林土, 即为测定管和对照管, 按照测定步骤操作, 记为 A 测定管、A 对照管。用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.278 - 0.066 = 0.212$, 标准曲线: $y = 3.6249x - 0.1862$, $x = 0.1099$, 计算酶活得: $S-AI \text{ (U/g 土样)} = 3.84 \times x \div W = 3.84 \times 0.1099 \div 0.02 = 21.1008 \text{ U/g 土样}$ 。
- 2、取两管 0.02g 林土, 即为测定管和对照管, 按照测定步骤操作, 记为 A 测定管、A 对照管。用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.272 - 0.066 = 0.206$, 标准曲线: $y = 3.6249x - 0.1862$, $x = 0.1082$, 计算酶活得: $S-AI \text{ (U/g 土样)} = 3.84 \times x \div W = 3.84 \times 0.1082 \div 0.02 = 20.7744 \text{ U/g 土样}$ 。