

土壤芳基酰胺酶活性测定试剂盒

分光法 24 样

产品简介:

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。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 6mL 蒸馏水, 充分溶解备用。
试剂三	液体 14mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 6mL 蒸馏水, 充分溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、天平、离心机、恒温水浴锅、乙醇、可调式移液器。

土壤芳基酰胺酶活性测定:

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、样本制备：

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、上机检测：

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

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	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）。

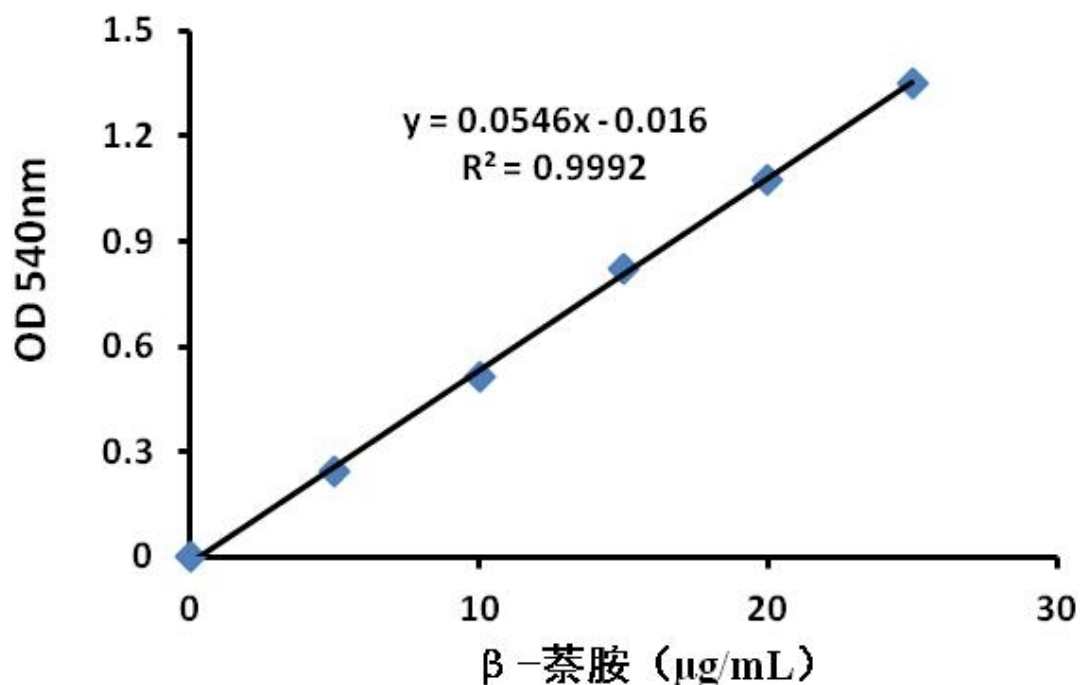
[注]: 1. 若 ΔA 值在零附近徘徊，可在 37°C 孵育阶段延长反应时间 T (如增至 3h 或更长)，或增加土壤样本量 W (如增至 0.2g)，则改变后的反应时间 T 和 W 需代入公式重新计算。

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。

结果计算：

1、标准曲线方程：

$y = 0.0546x - 0.016$ ，x 是标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)，y 是 ΔA 。



2、酶活定义：

37°C条件下，每克土样每小时释放出 1 μ g 的 β -萘胺为一个酶活力单位。

土壤芳基酰胺酶活性(μ g/h/g 土样) = $(\Delta A + 0.016) \div 0.0546 \times V1 \div W \div T$

= $9.2 \times (\Delta A + 0.016) \div W$

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：

1. 制备标准品母液 (2.5mg/mL)：标准品用 1mL 乙醇溶解。(母液需在两天内用)。
2. 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 5, 10, 15, 20, 25. μ g/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3. 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。