

土壤脂肪酶（S-LPS）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：AC10614

规格：50T/24S

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 30 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 6 mL×1 瓶	常温保存
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂四	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存
标准品	液体 59.3 μL×1 支	4℃保存

溶液的配制：

- 1、标准品：临用前加入 1.435 mL 甲苯，即 125 μmol/mL 油酸。用前注意解冻溶解。
- 2、工作液的配制：将试剂三临用前加入 20 mL 蒸馏水于沸水浴中溶解，冷却至常温后加入 5 mL 试剂二混合，高速震荡 2 次，每次 3min，间隔 5min。4℃保存，也可根据该比例现用现配。

产品说明：

脂肪酶（LPS）又称甘油酯水解酶，催化甘油三酯水解生成脂肪酸和甘油（或者甘油二酯和单酯）。该酶在土壤生物动力学中具有重要的作用。

LPS催化油酯水解成脂肪酸，利用铜皂法测定脂肪酸生成速率，即可计算LPS活性。

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：

台式离心机、震荡混匀器、可见分光光度计、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵、甲苯、冰和蒸馏水、30-50 目筛。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

新鲜土样自然风干，过30-50目筛。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上，调节波长至710nm，甲苯调零。
- 2、标准溶液的稀释：将油酸标准溶液用甲苯稀释25倍即为5μmol/mL的标准溶液待测。
- 3、操作表：取2mL EP管，加入下列试剂

加入试剂	对照管	测定管	标准管	空白管
土样（g）	0.1	0.1	-	-
甲苯（μL）	50	50	-	-

使土样充分润湿，常温放置 10min。			-	-
试剂一 (μL)	500	500	-	-
工作液 (μL)	-	500	-	-
37°C水浴反应 1h，期间可震荡数次使土样和样本充分接触。 之后沸水浴 10min，冷却至室温。			-	-
工作液 (μL)	500	-	-	-
甲苯 (mL)	1.2	1.2	-	-
反复震荡混匀后，室温 4000rpm 离心 10 min			-	-

取出离心管，小心吸取上层有机相 1 mL，加入另一 1.5mL EP 管中，按下表操作：

上层溶液 (mL)	1	1	-	-
标准品 (mL)	-	-	1	-
甲苯 (mL)	-	-	-	1
试剂四 (μL)	250	250	250	250

反复充分震荡混匀，室温 4000rpm 离心 10min，小心吸取有机相溶液 800 μL，加入 1mL 玻璃比色皿，于 710nm 处测定吸光值。记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管、A 空白管，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

三、S-LPS 活性计算

活性单位定义：37°C中每g土样每天水解橄榄油生成1μmol脂肪酸为一个酶活单位。

$$S-LPS (U/g \text{ 土样}) = \Delta A_{测定} \div (\Delta A_{标准} \div C_{标准}) \times V_{甲苯} \div T \div W = 144 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W$$

V_{甲苯}：加入的甲苯体积，1.2mL；C_{标准}：标准溶液浓度，5μmol/mL；T：催化反应时间，1/24d；W：样本质量，g。

注意事项：

- 1、甲苯有毒，实验过程中需佩戴手套和口罩。
- 2、实验过程中须远离火源。
- 3、当吸光度大于 0.8 时，建议将样本稀释后测量（第二次加入甲苯的量增加）。

实验实例：

- 1、取两管 0.1g 三叶草土，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。计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管} = 0.195 - 0.094 = 0.101$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管} = 0.754 - 0.028 = 0.726$ ，计算酶活得：
 $S-LPS (U/g \text{ 土样}) = 144 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W = 144 \times 0.101 \div 0.276 \div 0.1 = 200.33 U/g \text{ 土样}$ 。
- 2、取两管 0.1g 林土样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。计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管} = 0.143 - 0.074 = 0.069$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管} = 0.754 - 0.028 = 0.726$ ，计算酶活得：
 $S-LPS (U/g \text{ 土样}) = 144 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W = 144 \times 0.069 \div 0.726 \div 0.1 = 136.86 U/g \text{ 土样}$ 。