

土壤中性转化酶 (S-NI) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10625

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 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 30 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 30 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 试剂一溶解, 制备 10 mg/mL 葡萄糖标准液备用。

产品说明:

S-NI在中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-NI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NI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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵、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, 具体比例可以参考文献)**

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、分光光度计预热30min, 波长调至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0.3、0.2、0.1、0.08、0.06、0.04 mg/mL的葡萄糖标准溶液备用。
- 3、加样表:

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
风干土样 (g)	0.1	0.1	-	-
试剂一 (μL)	-	800	-	800
试剂二 (μL)	800	-	-	-
标准液 (μL)	-	-	800	-
甲苯 (μL)	20	20	20	20

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。				
上清液（ μL ）	700	700	700	700
试剂三（ μL ）	300	300	300	300

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-NI活性计算

1、标准曲线的绘制：

以葡萄糖浓度为x轴，相应的 ΔA 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-NI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。

$$\text{S-NI (U/g 土样)} = x \times V \div W \div T = 19.2 \times x \div W$$

V：加入的标准液体积，0.8mL；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，可以用试剂一将上清液稀释后测定（计算公式中乘以相应稀释倍数）；若吸光值较小，可以增加上清液体积或者土样质量进行测定。

实验实例：

- 1、取两管 0.1g 林土，测定管加入试剂二 800 μL 、甲苯 20 μL ，对照管加入试剂一 800 μL 、甲苯 20 μL ，37°C准确水浴 1h 后，煮沸 10min，离心取上清稀释 5 倍，之后按照测定步骤操作，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.191 - 0.074 = 0.117$ ，标准曲线： $y = 5.1864x - 0.1698$ ， $x = 0.055$ ，计算酶活得：

$$\text{S-NI (U/g 土样)} = 19.2 \times x \div W \times 5 \text{ (稀释倍数)} = 19.2 \times 0.055 \div 0.1 \times 5 \text{ (稀释倍数)} = 52.8 \text{ U/g 土样。}$$

- 2、取两管 0.1g 土样，测定管加入试剂二 800 μL 、甲苯 20 μL ，对照管加入试剂一 800 μL 、甲苯 20 μL ，37°C准确水浴 1h 后，煮沸 10min，离心取上清稀释 5 倍，之后按照测定步骤操作，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.161 - 0.086 = 0.075$ ，标准曲线： $y = 5.1864x - 0.1698$ ， $x = 0.047$ ，计算酶活得：

$$\text{S-NI (U/g 土样)} = 19.2 \times x \div W \times 5 \text{ (稀释倍数)} = 19.2 \times 0.047 \div 0.1 \times 5 \text{ (稀释倍数)} = 45.12 \text{ U/g 土样。}$$