

土壤蔗糖酶/酸性转化酶(Solid-Sucrase, S-SC)试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TR007-96 微板法 96 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

土壤蔗糖酶又叫土壤蔗糖转化酶, 因其在酸性介质中活性最大, 因此土壤中常测的蔗糖酶亦是酸性转化酶。其对增加土壤中易溶性营养物质起着重要的作用, 与土壤中的有机质、氮、磷含量、微生物活动和土壤呼吸强度有关, 一般情况下, 土壤肥力越高, 蔗糖酶活性越强, 因此该酶也是评价土壤熟化程度和肥力水平的一个指标。

本试剂盒采用 DNS 比色法, 即土壤蔗糖酶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, 生成有色氨基化合物, 在 540nm 有特征光吸收, 在一定范围内 540nm 光吸收增加速率与土壤蔗糖酶活性成正比。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	1. 临用前用 60mL 试剂二混匀, 备用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 120 mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂三	液体 50mL×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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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、样本提取:

取新鲜土样或 37 度烘箱风干, 先粗研磨, 过 40 目筛网, 备用。

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)	0.1g 鲜土/0.03g 干土	0.1g 鲜土/0.03g 干土
甲苯	30	30
试剂一	500	
试剂二		500
混匀, 于 37℃ 水浴锅或恒温培养箱中孵育 4 小时; 12000 rpm, 4℃ 离心 5min, 取上清液待测。		

② 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长为 540nm。

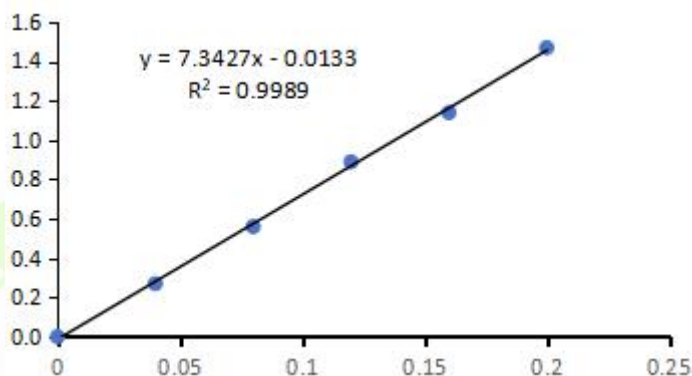
- ③ 显色反应：在 EP 管中依次加入（先检测 2-5 个样本，参看注意事项，依据 ΔA 判定上清液是否稀释或增加）：

试剂 (μL)	测定管	对照管
上清液	200	200
试剂三	200	200
混匀，95°C 水浴 5min（可用封口膜缠紧，以防止水分散失），取出后流水冷却至室温。		
蒸馏水	500	500
取 200 μL 于 96 孔板中，540nm 处分别读取吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个测定管需设一个对照管）。		

- 【注】：1. 若 ΔA 大于 1.5，则在显色反应阶段需减少孵育后得到的上清液体积（如减少为 50 μL ，则蒸馏水相应增加），则改变后的 V_1 需代入计算公式重新计算；或把孵育后得到的上清液稀释 2-5 倍再按照显色反应阶段操作表加样检测，则稀释倍数 D 需代入计算公式计算。
2. 若 ΔA 较小，可以延长 37°C 的孵育时间（如 10 小时或 24 小时），或在显色反应阶段，上清液增加到 400 μL （蒸馏水相应减少）检测。则改变后的时间 T 或 V_1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 7.3427x - 0.0133$ ； x 为标准品质量（mg）， y 为 ΔA 。



- 2、酶活性定义：每天每克土样中产生 1mg 葡萄糖定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{S-SC 活力}(\text{mg/d/g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0133) \div 7.3427 \times (V \div V_1)] \div W \div T \times D \\ &= 2.17 \times (\Delta A + 0.0133) \div W \times D \end{aligned}$$

V ---反应总体积：530 μL ；

V_1 ---显色反应中上清液体积：200 μL ；

T ---反应时间，4h=1/6d；

W ---土壤样本实际取样量，g；

D ---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 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°C 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, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 标品稀释参照表如下：

标品浓度	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
------	---	-----	-----	-----	-----	---

mg/mL						
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	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	200	
蒸馏水		200
试剂三	200	200
混匀，95℃水浴 5min（可用封口膜缠紧，以防止水分散失）， 取出后流水冷却至室温。		
蒸馏水	500	500
取 200μL 于 96 孔板中，540nm 处分别读取吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		