

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

(微板法 96 样)

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前用 60mL 试剂二混匀，备用
试剂二	液体 120 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

96 孔板、酶标仪、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、蒸馏水、甲苯。

四、土壤蔗糖酶/酸性转化酶(S-SC) 活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

取新鲜土样或 37 度烘箱风干，先粗研磨，过 40 目筛网，备用。

2、上机检测：

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℃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。		

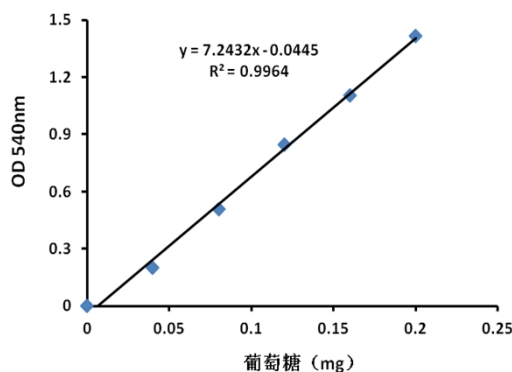
蒸馏水	500	500
取 200 μ L 于 96 孔板中, 540nm 处分别读取吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (每个测定管需设一个对照管)。		

【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 μ L, 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 $^{\circ}$ 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 μ L (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: $y = 7.2432x - 0.0445$; 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。

$$\begin{aligned} \text{S-SC 活力 (mg/d/g 土样)} &= [(\Delta A + 0.0445) \div 7.2432 \times (V \div V_1)] \div W \div T \times D \\ &= 2.2 \times (\Delta A + 0.0445) \div W \times D \end{aligned}$$

V ---反应总体积: 530 μ L;

V_1 ---显色反应中上清液体积: 200 μ L;

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:

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL): 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 $^{\circ}$ C 保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段加样体系操作, 200 μ L 上清液换成标准品, 以标准品的质量为横坐标, 吸光值为纵坐标, 即可制作标准曲线。