

土壤芳基酰胺酶活性测定试剂盒

微板法 48 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 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前用几下使试剂落入底部, 再加入 12.5 mL 蒸馏水, 充分溶解备用,
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前用几下使试剂落入底部, 再加入 10mL 乙醇, 充分溶解备用。
标准品	粉剂×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:

酶标仪、96 孔板、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:

取新鲜土样风干或者 30°C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 s 的干扰; 土壤过筛, 保证取样的均匀细腻;

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂 (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°C 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°C 离心 10min, 离心 10min, 上清液待测。		

③ 显色反应, 在 96 孔板中依次加入:

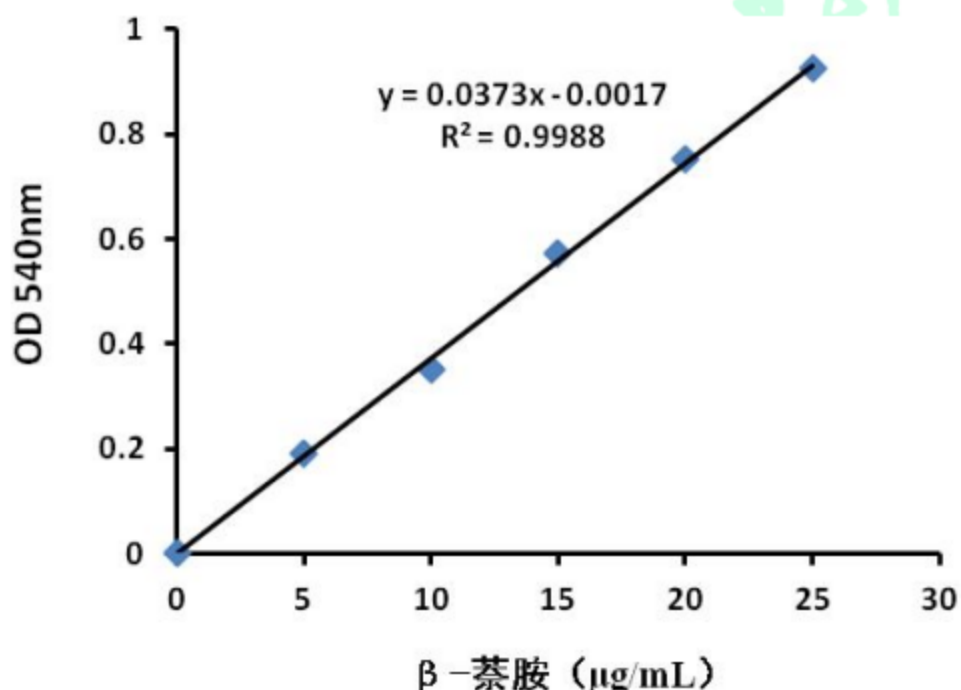
上清液	80	80
试剂三	80	80
试剂四	80	80
混匀, 10min 后, 于 540nm 处测定吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

[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: $y = 0.0373x - 0.0017$, 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 $1\mu\text{g}$ 的 β -萘胺为一个酶活力单位。

土壤芳基酰胺酶活性($\mu\text{g/h/g}$ 土样) = $(\Delta A + 0.0017) \div 0.0373 \times V1 \div W \div T$

= $13.4 \times (\Delta A + 0.0017) \div W$

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. $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。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。

mlbio 酶联生物
Good elisakit producers