土壤芳基酰胺酶活性测定试剂盒说明书

（货号：G0344W 微板法 48 样）

一、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。

二、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℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加入 12.5mL 蒸馏水，充分溶解备用，
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩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 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：

酶标仪、96 孔板、天平、离心机、恒温水浴锅、**乙醇**、可调式移液器。

四、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，了解本批样本情况，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℃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：

试剂名称（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℃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℃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：

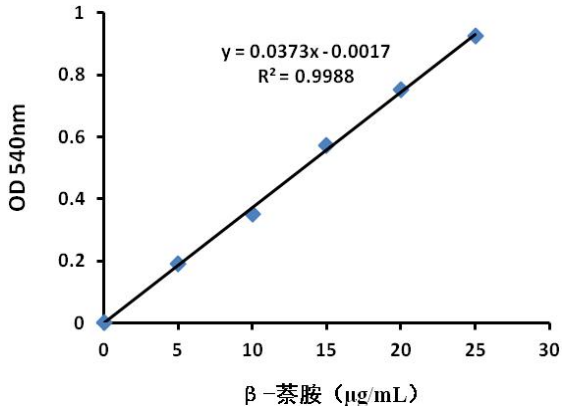
上清液	80	80
试剂三	80	80
试剂四	80	80
混匀，10min 后，于 540nm 处测定吸光值 A， ΔA=A 测定-A 对照（每个样本做一个自身对照）。		

【注】：1.若ΔA 值在零附近徘徊，可在 37℃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。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 0.0373x - 0.0017，x 是标准品浓度（μg/mL）, y 是ΔA。



2、酶活定义：37℃条件下，每克土样每小时释放出 1μg 的β-萘胺为一个酶活力单位。

土壤芳基酰胺酶活性(μg/h/g 土样)=(ΔA+0.0017)÷0.0373×V1÷W÷T

=13.4×(ΔA+0.0017)÷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. μg/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。