

土壤中转化酶（S-NI）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC4040

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 80 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

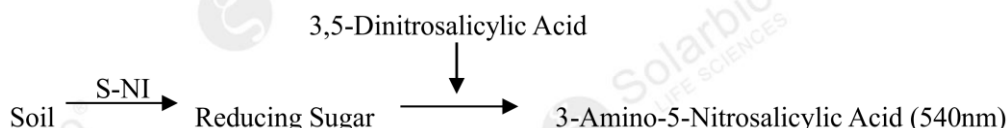
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 25 mL 试剂一充分溶解备用，用不完的试剂 2-8℃保存 4 周。
- 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 葡萄糖标准品备用，2-8℃保存 4 周。

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、恒温培养箱/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（>98%，AR）。

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℃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、标准品的稀释：将10mg/mL葡萄糖标准品用试剂一稀释至0.3、0.2、0.1、0.08、0.06、0.04 mg/mL的葡萄糖标准品备用。





3、标准品稀释表

序号	稀释前浓度 (mg/mL)	标准品体积 (μL)	试剂一体积 (μL)	稀释后浓度 (mg/mL)
1	10	100	1900	0.5
2	0.5	600	400	0.3
3	0.5	400	600	0.2
4	0.5	200	800	0.1
5	0.5	160	840	0.08
6	0.5	120	880	0.06
7	0.5	80	920	0.04

备注：下述实验中每个标准管需 800μL 标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

4、加样表：（在1.5mLEP管中加入下列试剂）

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	-	-	-
标准品 (μL)	-	-	800	-
甲苯 (μL)	20	20	20	20
混匀，于37℃水浴锅/恒温培养箱中准确反应1h后，煮沸10min左右（缠封口膜，防止爆盖），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，取上清待测。				
上清液 (μL)	700	700	700	700
试剂三 (μL)	300	300	300	300
充分混匀后，煮沸 10min 左右（缠封口膜。防止爆盖），流水冷却，记录各管 540nm 的吸光值，记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。标准曲线只需测 1-2 次。				

三、S-NI活性计算

1、标准曲线的绘制：

根据葡萄糖标准品的浓度 (x, mg/mL) 和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ (y, $\Delta A_{\text{标准}}$)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ (y, $\Delta A_{\text{测定}}$) 带入公式计算样本浓度 (x, mg/mL)。

2、S-NI活性计算

单位定义：37℃每g土壤每天产生1mg还原糖定义为一个酶活性单位。

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

V：加入的标准品体积，0.8mL；W：样本质量，g；T：反应时间：1/24d。

注意事项：

- 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；
- 如果吸光值大于 1.6，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 蘑菇土样，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.889-0.104=0.785，带入标准曲线 $y = 4.2244x - 0.177$ ， $R^2=0.9941$ ，计算 $x=0.228$ ，计算酶活得：
 $S-NI (U/g \text{ 土样}) = 19.2 \times x \div W = 43.776 U/g \text{ 土样}$ 。
2. 取两管 0.1g 土样 2 号，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.547-0.224= 0.323，带入标准曲线 $y = 4.2244x - 0.177$ ， $R^2=0.9941$ ，计算 $x=0.118$ ，计算酶活得：
 $S-NI (U/g \text{ 土样}) = 19.2 \times x \div W = 22.656 U/g \text{ 土样}$ 。

相关系列产品：

BC3070/BC3075 土壤酸性转化酶（S-AI）活性检测试剂盒

