

**土壤芳基酰胺酶（Soil Arylamidase, S-AAS）试剂盒说明书**

微量法 100T/48S

**注意：**正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**测定意义**

土壤芳基酰胺酶催化多肽、酰胺或芳基酰胺水解释放 N 末端氨基酸，可能与 N 的矿化有关。

**测定原理**

土壤芳基酰胺酶催化 L-亮氨酸 β-萘胺水解产生 β-萘胺，β-萘胺进一步与对二甲氨基肉桂醛反应生成红色偶氮化合物，在 540nm 处检测吸光值。

**需自备的仪器和用品**

天平、水浴锅、离心机、酶标仪、96 孔板、蒸馏水、无水乙醇。

**试剂的组成和配制**

试剂一：液体 18mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存。临用前加入 6mL 蒸馏水，充分溶解待用。

试剂三：95%乙醇，自备。

试剂四：液体 18mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂五：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存。临用前加入 12mL 无水乙醇，充分溶解待用。

**测定操作表**

## 1. 酶促反应

在 EP 管中加入如下试剂

	测定管	对照管
土样 (g)	0.05	0.05
试剂一 (μL)	150	150
试剂二 (μL)	50	
充分混匀，37℃ 震荡反应 2h		
试剂二 (μL)		50
试剂三 (μL)	300	300
充分混匀，12000g，25℃ 离心 10min，取上清		

## 2. 显色反应

在 EP 管中加入如下试剂

	测定管	对照管
上清 (μL)	50	50
试剂四 (μL)	150	150
试剂五 (μL)	100	100

充分混匀，静置 5min。取 200μL 加入 96 孔板，测定 540nm 下吸光值，记作 A 测定和 A 对照， $\Delta A = A \text{ 测定} - A \text{ 对照}$ 。**计算公式**标准条件下的标准曲线： $y = 0.0403x + 0.0027$ ， $R^2 = 0.9993$ ；其中 x 为标准品浓度 (μg/mL)，y 为吸光值  $\Delta A$ 。

酶活单位定义：每 g 土样每 h 催化生成 1μg 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) =  $(\Delta A - 0.0027) \div 0.0403 \times V \text{ 反总} \div W \div T$

$$= 124 \times (\Delta A - 0.0027)$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.5mL; T: 反应时间, 2h; W: 样本质量, 0.05g。