

ICS 13.080.30
B10

团 体 标 准

T/NAIA XXXX—2020

土壤蔗糖酶活性的测定 (3,5-二硝基水杨酸比色法)

2020-XX-XX 发布

2020-XX-XX 实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》规定编写。

本标准由宁夏昊标检测服务研究院（有限公司）提出。

本标准由宁夏化学分析测试协会归口。

本标准起草单位：宁夏昊标检测服务研究院（有限公司）、宁夏大学、宁夏农林科学院荒漠所、宁夏化学分析测试协会。

本标准主要起草人：任亚丽、白玲、杨婷、燕翀、杨洁、季波、张小飞、刘娜娜。

本标准于 2020 年 XX 月 XX 日首次发布。

土壤蔗糖酶的测定

(3,5-二硝基水杨酸比色法)

1 范围

本标准规定了土壤蔗糖酶的测定方法(3,5-二硝基水杨酸比色法)。

本标准适用于各类土壤蔗糖酶的测定(3,5-二硝基水杨酸比色法)。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的应用文件,仅注日期的版本适用于本文件,凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 1121.1 土壤检测 第一部分:土壤样品的采集、处理和贮存

3 原理

土壤蔗糖酶将蔗糖酶促水解为还原糖,还原糖与3,5-二硝基水杨酸在沸水浴中反应而生成橙色的3-氨基-5-硝基水杨酸,颜色深度与还原糖量呈正相关,因而可用还原糖量来表示蔗糖酶的活性。

4 试剂和溶液

除非另有说明外,本方法均使用符合国家标准和分析纯试剂,分析用水为GB/T 6682规定的三级水。

4.1 甲苯(C_7H_8)。

4.2 蔗糖($C_{12}H_{22}O_{11}$)。

4.3 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。

4.4 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

4.5 葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)。

4.6 3,5-二硝基水杨酸($C_7H_4N_2O_7$)。

4.7 酒石酸钾钠($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)。

4.8 酶促反应试剂

4.8.1 蔗糖水溶液(80 g/L)

称取8 g(精确至0.01 g)蔗糖加水溶解后并定容至100 mL。

4.8.2 磷酸缓冲液(pH 5.5)

磷酸氢二钠溶液:称取11.876 g(精确至0.0001 g)二水合磷酸氢二钠用水溶解定容

至 1 L (A 液)；磷酸二氢钾溶液：称取 9.078 g (精确至 0.0001 g) 磷酸二氢钾用水溶解定容至 1 L (B 液)；取 A 液 0.5 mL，B 液 9.5 mL 混合均匀即可。

4.9 葡萄糖标准液 (1 mg/mL)

预先将葡萄糖置 98 °C~100 °C 干燥 2 h，准确称取 50 mg (精确至 0.0001 g) 葡萄糖于烧杯中，用水溶解后，移至 50 mL 容量瓶中，定容，摇匀备用 (4 °C 冰箱中保存期不超过 7 d)。若该溶液发生混浊和出现絮状物现象，则应弃之，重新配制。

4.10 3,5-二硝基水杨酸试剂 (DNS 试剂)

称取 0.5 g (精确至 0.0001 g) 3,5-二硝基水杨酸，溶于 20 mL 2 mol/L 氢氧化钠溶液中再加入 50 mL 水，再称取 30 g (精确至 0.01 g) 酒石酸钾钠，溶于上述溶液中，用水定容至 100 mL (保存期不超过 7 d)。

5 仪器设备

5.1 电子天平：感量 0.0001g 和 0.01g。

5.2 恒温培养箱 (37 °C±1 °C)。

5.3 分光光度计 (540 nm)。

6 操作步骤

6.1 标准曲线绘制

分别吸取 1 mg/mL 的标准葡萄糖溶液 (4.9) 0.00、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mL 于 50 mL 比色管中，再补加水至 1 mL，加 DNS 试剂 (4.10) 3 mL 混匀，于沸水浴中准确反应 5 min (从试管放入重新沸腾时算起)，取出后立即于冷水浴中冷却至室温，用水定容至 50 mL，以空白管调零在波长 540 nm 处比色，以吸光值为纵坐标，以葡萄糖浓度为横坐标绘制标准曲线。

6.2 土壤蔗糖酶测定

称取 5 g 土壤 (精确至 0.0001 g) (如含量高可适当减少称样量)，置于 50 mL 具塞三角瓶中，加入 15 mL 80 g/L 蔗糖溶液 (4.8.1)，5 mL pH 5.5 磷酸缓冲液 (4.8.2) 和 5 滴甲苯 (4.1)。摇匀混合后，放入恒温培养箱，在 37 °C±1 °C 下培养 24 h，取出迅速过滤。准确吸取滤液 1.00 mL，注入 50 mL 容量瓶中，加入 3 mL DNS 试剂 (4.10)，沸水水浴 5 min，随即将容量瓶移至自来水流下冷却 3 min。溶液因生成 3-氨基-5-硝基水杨酸而呈橙黄色，最后用水定容至 50 mL，在分光光度计上于 540 nm 处进行比色。

注意事项：

①每一个样品应该做一个无基质对照，以等体积的水代替基质 (80 g/L 蔗糖水溶液)，其他操作与样品实验相同，以排除土样中原有的蔗糖、葡萄糖对实验结果的影响。

②整个实验设置一个无土对照，不加土样，其他操作与样品实验相同，以检验试剂纯度和基质自身分解，即空白试验。

③如果样品吸光值超过标曲的最大值，则应该增加分取倍数或减少培养的土样。

7 结果计算

蔗糖酶活性以 24 h, 1 g 风干土壤可水解生成葡萄糖毫克数表示, 按式 (1) 计算:

$$X = \frac{(C_1 - C_2) \times V \times N}{m \times f} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X —— 样品中蔗糖酶的含量, 单位为毫克每克每 24 h (mg/g · 24h) ;
C₁ —— 加基质样品由标准曲线求得的葡萄糖的含量, 单位为毫克每毫升 (mg/mL) ;
C₂ —— 未加基质样品由标准曲线求得葡萄糖的含量, 单位为毫克每毫升 (mg/mL) ;
V —— 显色定容体积, 单位为毫升 (mL) ;
N —— 为分取倍数=浸出液体积 (mL) / 吸取滤液体积 (mL) ;
m —— 表示烘干土重, 单位为克 (g) ;
f —— 表示风干土壤占新鲜土壤的比例。
结果保留三位有效数字。

8 精密度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。
