

土壤甘氨酸氨基肽酶 (S-GAP) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TR067 微板法 48 样)

有效期: 6 个月

一、产品简介:

土壤甘氨酸氨基肽酶 (S-GAP) 是一类能水解肽链 N-末端为甘氨酸的酶, 由土壤微生物分泌。本试剂盒利用土壤甘氨酸氨基肽酶 (S-GAP) 分解甘氨酸对硝基苯胺生成对硝基苯胺, 该物质在 405nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率来计算 S-GAP 活性。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存条件	备注
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	-20°C保存	临用前甩几下, 使试剂落入底部, 再加 5.4mL 乙醇混匀溶解。
试剂三	液体 35mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C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、台式离心机、恒温振荡培养箱/水浴锅、可调式移液器、天平。

四、土壤甘氨酸氨基肽酶 (S-GAP) 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、样本处理:

取新鲜土样或干土 (风干或者 37 度烘箱风干), 先粗研磨, 过 40 目筛网备用。

【注】土壤风干, 减少土壤中水分对于实验的干扰; 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 405nm。

② 在 EP 管中依次加入:

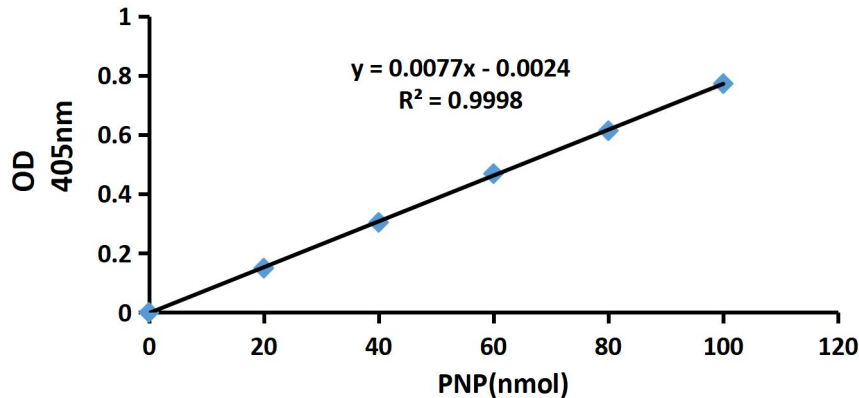
试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
土样 (g)	0.05	0.05	
试剂一	400	500	400
试剂二	100		100
充分混匀, 37°C培养 2 小时 (振荡培养或间隔 20min 手动振荡混匀几下)			
试剂三	300	300	300
混匀, 8000rpm 离心 5min (若上清液不澄清可加大离心力), 取 200μL 上清液至 96 孔板中, 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ (每个样本做一个自身对照)。			

【注】：1.若 ΔA 较小，可延长37°C的孵育时间T（如增至4小时或更长），或增加土样质量W（如增至0.2g）。则改变后的T和W需代入计算公式重新计算。

2.若测定管A值大于1.5或 ΔA 大于1.5，可缩短37°C的孵育时间T（如减至0.5小时或更短）。则改变后T需代入计算公式重新计算。或对最后一步的待检测上清液（包括测定管、对照管和空白管）同时用蒸馏水进行稀释，稀释倍数D代入计算公式。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0077x - 0.0024$ ；x为标准品摩尔质量（nmol），y为 ΔA 。



2、单位定义：每小时每克土样生成1 nmol对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$S\text{-GAP}(\text{nmol/h/g 土样}) = (\Delta A + 0.0024) \div 0.0077 \div W \div T \times D = 65 \times (\Delta A + 0.0024) \div W \times D$$

T---反应时间，2h；

W---土壤样本实际取样量，g。

D---稀释倍数，未稀释即为1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（50 $\mu\text{mol/mL}$ ）：临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，加入0.5mL乙醇，涡旋震荡溶解后再加入0.5mL的蒸馏水混匀，得到50 $\mu\text{mol/mL}$ 备用。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度：0,0.4,0.8,1.2,1.6, 2 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在EP管依次加入：50 μL 标准品+450 μL 试剂一+300 μL 试剂三，混匀，取200 μL 至96孔板中，于405nm下读取吸光值，根据结果制作标准曲线。