

## 土壤 $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $S-\beta$ -GAL) 试剂盒说明书

(货号:ADS-W-TR068 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

土壤 $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -GAL, EC 3.2.1.23)又称 $\beta$ -D-半乳糖苷半乳糖基转移酶, 参与土壤中碳水化合物的水解。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法,  $\beta$ -GAL分解对-硝基苯- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷生成对-硝基苯酚 (PNP), 后者在405nm有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率来计算 $\beta$ -GAL活性。

### 二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂 1 瓶	4°C避光保存	1. 临用前加入 8mL 蒸馏水, 充分溶解备用; 2. 用不完的试剂仍-20°C保存;
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

### 三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 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、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

② 在 EP 管中依次加入:

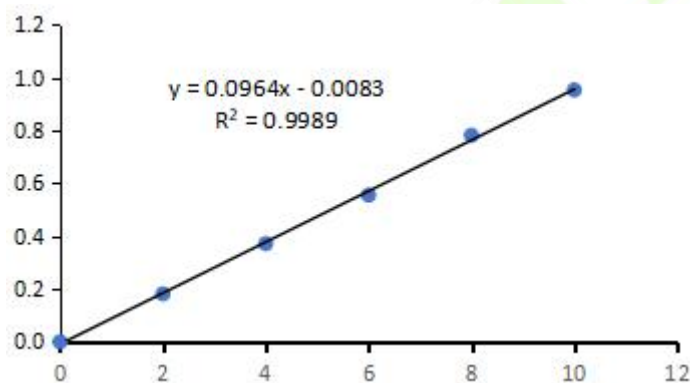
试剂组分 ( $\mu$ L)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
土样 (g)	0.1	0.1	
试剂一	150		150
蒸馏水		150	
试剂二	300	300	300
混匀, 37°C振荡反应 1h			
试剂三	350	350	350

混匀，12000rpm 室温离心 10min，取上清液 200μL 于 96 孔板中，于 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 $\Delta A$  在零附近徘徊，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  $\Delta A$  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、标准曲线方程为  $y = 0.0964x - 0.0083$ ；x 为标准品质量（μg），y 为  $\Delta A$ 。



- 2、单位定义：每小时每克土样中产生 1nmol 对-硝基苯酚（PNP）定义为一个酶活单位。
- $$S\text{-}\beta\text{-GAL 活力}(\text{nmol/h/g 土样}) = (\Delta A + 0.0083) \div 0.0964 \div Mr \times 10^3 \div W \div T \times D$$
- $$= 74.6 \times (\Delta A + 0.0083) \div W \times D$$

T---反应时间，1h；  
W---实际称取土样质量，g；  
Mr--- PNP 相对分子质量，139.11；  
D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水，标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 1mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水	130	150
试剂二	300	300
试剂三	350	350

混匀，取 200μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值，  
 $\Delta A = A$  测定-0 浓度管。