

土壤 α -葡萄糖苷酶 (Solid- α -Glucosidase, S- α -GC) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TR040 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

土壤 α -葡萄糖苷酶 (α -GC, EC 3.2.1.20)在广泛分布在微生物中, 是一类能够从含有 α -糖苷键底物的非还原端催化水解 α -1,4-糖苷键, 释放出葡萄糖, 该酶与淀粉等糖代谢密切相关, 在土壤微生物的糖类代谢方面具有重要生理功能。

土壤 α -葡萄糖苷酶能够催化对-硝基苯- α -D 吡喃葡萄糖苷生成黄色物质对-硝基苯酚 (PNP), 该物质在 405nm 有特征光吸收, 进而得到土壤 α -葡萄糖苷酶的活性。

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	-20°C保存	1. 临用前加入 4mL 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 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 18mL×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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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、测定步骤:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

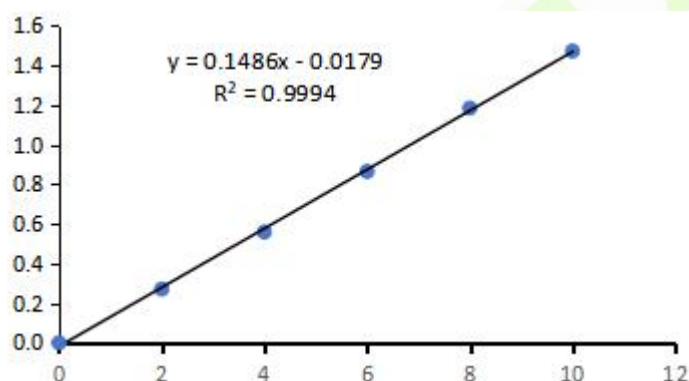
试剂组分 (μ L)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
土样 (g)	0.05	0.05	
试剂一	150		150
蒸馏水		150	
试剂二	300	300	300
混匀, 37°C振荡反应 1h			
试剂三	350	350	350
混匀, 12000rpm 室温离心 10min, 取全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中, 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$			

(每个样本需做一个自身对照)。

- 【注】：1.若 ΔA 在零附近徘徊，可延长 37℃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℃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 $y = 0.1486x - 0.0179$ ；x 为标准品质量（ μg ），y 为 ΔA 。



- 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。

$$\begin{aligned} S-\alpha\text{-GC 活力}(\text{nmol/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0179) \div 0.1486 \div \text{Mr} \times 10^3 \div W \div T \times D \\ &= 48.4 \times (\Delta A + 0.0179) \div W \times D \end{aligned}$$

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 mg/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，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		