

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

(分光法 24 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg \times 1 瓶	-20 $^{\circ}$ C保存	临用前加入 4mL 蒸馏水, 充分溶解备用, 用不完的试剂仍-20 $^{\circ}$ C保存。
试剂二	液体 15mL \times 1 瓶	4 $^{\circ}$ C保存	
试剂三	液体 18mL \times 1 瓶	4 $^{\circ}$ C保存	
标准品	粉剂 \times 1 支	4 $^{\circ}$ C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、恒温振荡培养箱/水浴锅、台式离心机、可调式移液器、天平。

四、土壤 α -葡萄糖苷酶 (S- α -GC) 酶活检测:

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、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:

试剂名称 (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 $^{\circ}$ 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)。			

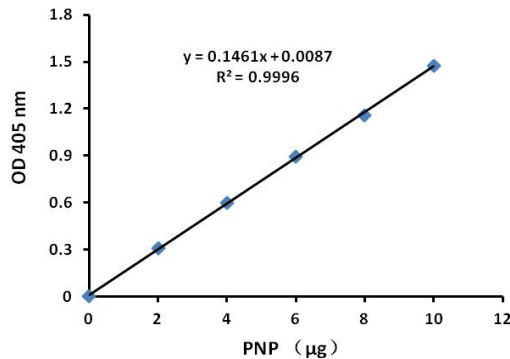
【注】: 1.若 ΔA 在零附近徘徊, 可延长 37 $^{\circ}$ C的孵育时间 T (如增至 4 小时或更长), 或增加土样质量 W (如增至 0.2g)。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

2.若测定管 A 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1.5, 可缩短 37 $^{\circ}$ 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 $y = 0.1461x + 0.0087$; 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。

$$\begin{aligned} S-\alpha\text{-GC 活力}(\text{nmol/h/g 土样}) &= (\Delta A - 0.0087) \div 0.1461 \div \text{Mr} \times 10^3 \div W \div T \times D \\ &= 49.2 \times (\Delta A - 0.0087) \div W \times D \end{aligned}$$

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:

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管中依次加入: 20 μL 标准品+130 μL 蒸馏水+300 μL 试剂二+350 μL 试剂三, 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。
- 4 根据结果制作标准曲线。