

土壤 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (S-NAG) 试剂盒说明书

(分光法 24 样)

一、产品简介:

土壤 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAG, EC 3.2.1.52) 是溶酶体中的一种酸性水解酶, 由土壤微生物分泌, 该酶的活性变化与机体某些病理状态密切相关。

土壤 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (S-NAG) 分解 4-硝基酚-β-N-乙酰氨基葡萄糖生成对-硝基苯酚 (PNP), 在 405nm 处检测该产物的升高速率, 来计算 S-NAG 活力大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前加入 4.5mL 蒸馏水, 充分溶解备用, 用不完的试剂仍-20℃保存;
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃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)、台式离心机、水浴锅或恒温培养箱、可调式移液器、天平。

四、土壤 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (S-NAG) 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、样本的制备:

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 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 (μL)	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℃振荡反应 1h			
试剂三	350	350	350
混匀, 12000rpm, 离心 10min, 取全部上清液于 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中, 于 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{测定} - A_{对照} - A_{空白}$ (每个测定管需设一个对照管)。			

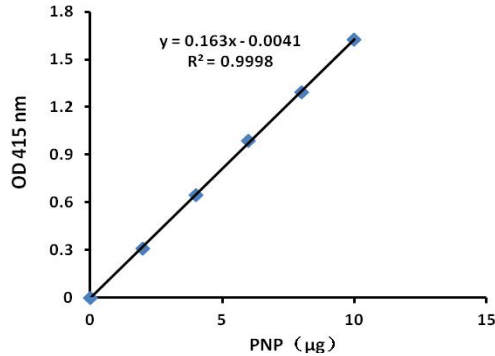
【注】: 1. 若 ΔA 在零附近徘徊, 可延长 37℃的孵育时间 T (如增至 4 小时或更长), 或增加土样质量 W (如增至 0.2g)。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

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: $y = 0.163x - 0.0041$; x 为标准品质量 (μg), y 为吸光值 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。

$$\begin{aligned} \text{S-NAG 活力}(\text{nmol/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0041) \div 0.163 \div \text{Mr} \times 10^3 \div \text{W} \div \text{T} \times \text{D} \\ &= 44.1 \times (\Delta A + 0.0041) \div \text{W} \times \text{D} \end{aligned}$$

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, 0.5mg/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, 取全部上清液于 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。