

## 土壤 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶（S- $\alpha$ -Afa）活性测定试剂盒说明书

### (微板法 48 样)

#### 一、产品简介：

土壤 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶（S- $\alpha$ -Afa，EC 3.2.1.55）是一种能够水解非还原呋喃阿拉伯糖残基的糖苷酶类。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法，S- $\alpha$ -Afa分解对-硝基苯阿拉伯呋喃糖苷生成对-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即可得出 $\alpha$ -Afa酶活性大小。

#### 二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加 15.5mL 试剂一，充分溶解备用。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×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：

酶标仪、96孔板、台式离心机、恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、蒸馏水。

#### 四、土壤 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶（S- $\alpha$ -Afa）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、样本制备：

取新鲜土样或者 37 度烘箱风干（需先粗研磨），过 40 目筛网，备用。

##### 2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 405 nm。
- ② 在离心管中依次加入下列试剂：

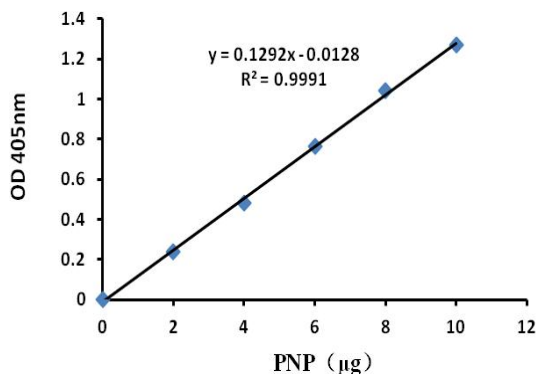
试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	对照管
土壤（g）	0.1g	0.1g
试剂一		300
试剂二	300	
迅速混匀，37℃保温 1h（间隔 15min 振荡混匀一次）		
试剂三	200	200
混匀，12000rpm，离心 5min，立即取上清液 200 $\mu$ L 于 96 孔板中，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定 - A 对照（每个样本需做一个自身对照）。		

- 【注】：**
1. 若 A 测定超过 1.8，可对最后一步的待检测上清液(测定管和对照管)同时进行稀释（用水稀释即可），稀释倍数 D 代入计算公式；
  2. 若  $\Delta A$  过小，可以增加土样量或延长保温时间（如：2h 或更长），重新调整的样本量 W 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。
  3. 若同时检测同一背景下的土壤样本，此批土壤样本可做一个样本自身对照，节省时间；若是不

同背景下的土壤样本（如黑土，红土，黄土等），则每个样本需做一个自身对照，即按照说明书加样表操作即可，

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.1292x - 0.0128$ ； $x$  是标准品 PNP 质量（ $\mu\text{g}$ ）， $y$  是  $\Delta A$ 。



2、活性定义：在  $37^{\circ}\text{C}$ ，每小时每克土壤产生  $1\mu\text{g}$  对-硝基苯酚（PNP）定义为 1 个酶活单位。

$$S-\alpha\text{-Afa}(\mu\text{g/h/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0128) \div 0.1292] \div W \div T \times D = 7.74 \times (\Delta A + 0.0128) \div W \times D$$

W---土壤样品质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

T---催化反应时间，1 h；

PNP 相对分子质量---139.11。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（ $1\text{mg/mL}$ ）：向标准品 EP 管里面加入  $1\text{ml}$  蒸馏水溶解，若有结晶析出，需  $37^{\circ}\text{C}$  水浴至完全溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8,  $1\text{ mg/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管中直接加入： $10\mu\text{L}$  标准品+ $290\mu\text{L}$  试剂一+ $200\mu\text{L}$  试剂三，混匀，立即取上清液  $200\mu\text{L}$  于 96 孔板中，立即于  $405\text{nm}$  下读取吸光值 A。
- 4 根据结果制作标准曲线。