

## 土壤 $\alpha$ -半乳糖苷酶活性检测试剂盒说明书

规格：微量法 48样

检测原理：荧光法

编号：JLC\_K14819

### 注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

### 测定意义

S- $\alpha$ -GAL能够催化水解芳基或羟基与糖基原子团之间的糖苷键生成葡萄糖，是纤维素分解酶系中重要组成成分之一，在土壤微生物的糖类代谢方面具有重要生理功能。

### 测定原理

S- $\alpha$ -GAL分解4-MUF - $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷，产生荧光物质，通过测定荧光值升高速率来计算S-AGC活。

### 自备用品

酶标仪、台式离心机、恒温培养箱、可调式移液器、黑色96孔板和蒸馏水。

### 试剂组成和配制

试剂一：液体60mL×1瓶，4°C保存；

试剂二：粉剂×1瓶，-20°C避光保存(临用前加入0.24mL试剂三溶解后加入11.76mL蒸馏水混匀)；

试剂三：液体8mL×1瓶，常温避光保存；

标准品：粉剂×1瓶，-20°C避光保存。

### 样品处理

新鲜土样自然风干或37度烘箱风干，过30~50目筛。按照土壤质量 (g)：试剂一 (mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约0.1g土壤，加入1mL试剂一），冰浴匀浆混匀3min，制成匀浆待测液。

### 测定步骤

1、荧光酶标仪预热30min以上，设置激发光波长 355 nm，测定波长 450nm。

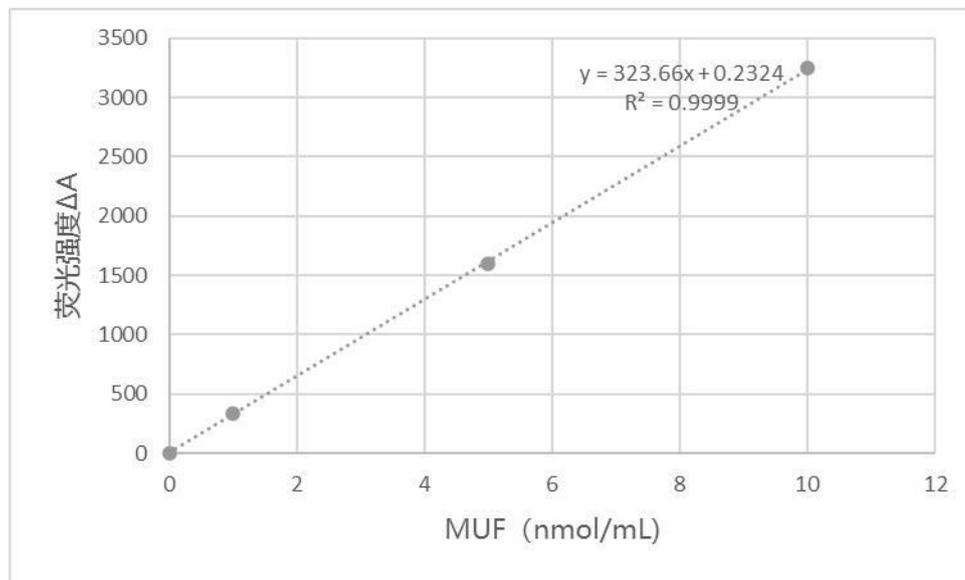
## 2、加样表

试剂名称	测定管	空白管
震荡条件下取匀待测液 (μL)	200	-
蒸馏水 (μL)	-	200
试剂二 (μL)	200	200

混匀，30℃避光振荡反应3h后，3000g 4℃离心3min，取上清液200μL于黑色96孔板中，检测荧光值，激发波长355nm，发射波长450nm。荧光值分别为A测定A空白，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

**S-AGAL活力计算：**

标准曲线： $y = 323.66x + 0.2324$ ， $R^2 = 0.9999$ ；MUF 标准品浓度(nmol/mL)，y：荧光强度 $\Delta A$



单位的定义：每小时每g土样中释放1 nmol 4-MU定义为一个酶活力单位。

S- $\alpha$ -GAL酶活(nmol/h /g 土样) =  $(\Delta A - 0.2324) \div 323.66 \times V \div V1 \times V_{\text{提}} \div T \div W$

V：反应总体积，0.4 mL； V1：加入反应体系中的匀浆待测液体积，0.2mL

V<sub>提</sub>：加入提取液体积，1mL； W：土壤样品质量，g；

T：催化反应时间，3 h。

**预实验的意义****比色法检测试剂盒预实验非常重要**

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；

- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3 - 5组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。

**附：标准曲线的绘制（选做）**

称取4.4mg标准品，加入5mL试剂三溶解，制成将标准品母液(5 $\mu$ mol/mL) 使用试剂一稀释为10 nmol/mL, 9 nmol/mL, 7 nmol/mL, 5 nmol/mL, 3 nmol/mL, 1 nmol/mL, 0; (也可根据自身实验需求调整标准品浓度)

依据加样表测定步骤操作，根据结果绘制标准曲线

试剂名称 ( $\mu$ L)	标准管	空白管 (只做一管)
标准品	200	
试剂一		200

于黑色96孔板中，检测荧光值，激发波长355nm，发射波长450nm。荧光值分别为A标准管，A空白管，计算 $\Delta A = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

以标准品浓度 (nmol/mL) 为横坐标 (x)，以其对应的荧光强度 $\Delta A$ 为纵坐标 (y)，绘制拟合曲线，即可得到线性方程 $y = kx + b$ ;