



## 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：TW55481

### 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烃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 活性。

### 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 $\times$ 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存；

试剂二：粉剂 $\times$ 1 瓶，-20 $^{\circ}$ 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 $\times$ 1 瓶，常温避光保存；

标准品：粉剂 $\times$ 1 瓶，-20 $^{\circ}$ 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

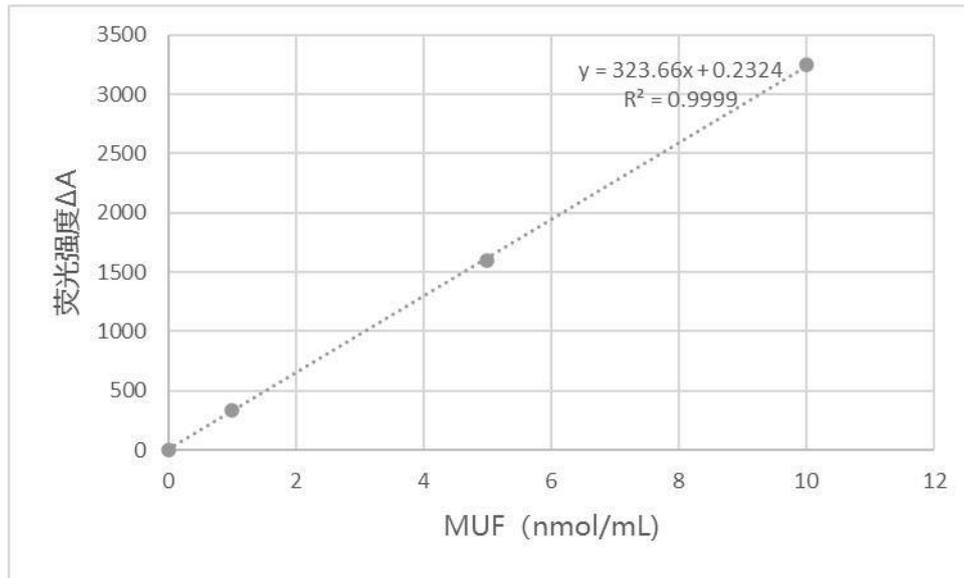
- 1、荧光酶标仪预热 30min 以上，设置激发光波长 355 nm，测定波长 450nm。
- 2、加样表

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°C避光振荡反应 3h 后，3000g 4°C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 $\times V \div V1 \times V$  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 提: 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  $y = kx + b$ ;