

土壤 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (S- α -Afa) 活性试剂盒说明书

(货号:ADS-W-TDX035-48 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

土壤 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (S- α -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- α -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 α -Afa酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	-20℃ 避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 15.5mL 试剂一, 充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃ 避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤:

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:

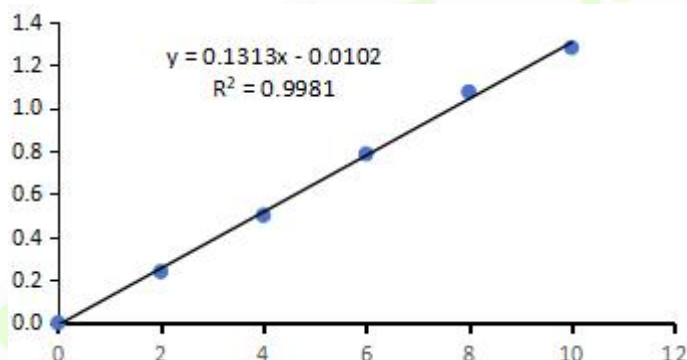
试剂组分 (μ L)	测定管	对照管
土壤 (g)	0.1g	0.1g

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 200μL 于 96 孔板中，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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 ΔA 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： $y = 0.1313x - 0.0102$ ；x 是标准品 PNP 质量（μg），y 是 ΔA 。



2、活性定义：在 37℃，每小时每克土壤产生 1μg 对-硝基苯酚（PNP）定义为 1 个酶活单位。

$$S-\alpha\text{-Afa}(\mu\text{g/h/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0102) \div 0.1313] \div W \div T \times D = 7.62 \times (\Delta A + 0.0102) \div W \times D$$

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：

- 向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水溶解，若有结晶析出，需 37℃水浴至完全溶解，标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 标品稀释参照表如下：

标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200

水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
蒸馏水		10
试剂一	290	290
试剂三	200	200
混匀，立即取上清液 200μL 于 96 孔板中，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		