

土壤芳基酰胺酶活性测定试剂盒

(微板法 48 样)

产品简介:

土壤 β -半乳糖苷酶 (β -GAL, EC 3.2.1.23)又称 β -D-半乳糖苷半乳糖基转移酶, 参与土壤中碳水化合物的水解。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法, β -GAL 分解对-硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷生成对-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来计算 β -GAL 活性。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 12.5mL 蒸馏水, 充分溶解备用,
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 10mL 乙醇, 充分溶解备用。
标准品	粉剂×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、天平、离心机、恒温水浴锅、乙醇、可调式移液器。

土壤芳基酰胺酶活性测定:

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、样本处理:

取新鲜土样风干或者 30°C烘箱风干, 先粗研磨, 过 40 目筛备用。

【注】: 土壤风干, 减少土壤中水分对于实验 s 的干扰; 土壤过筛, 保证取样的均匀细腻;

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	0.1g 土壤	0.1g 土壤
试剂一	300	300
试剂二	100	
混匀, 于 37°C 孵育 2h (间隔 30min 振荡混匀一次)		
95%乙醇	600	600
试剂二		100
立即混匀, 于 12000rpm, 室温或 4°C 离心 10min, 离心 10min, 上清液待测。		

③ 显色反应, 在 96 孔板中依次加入:

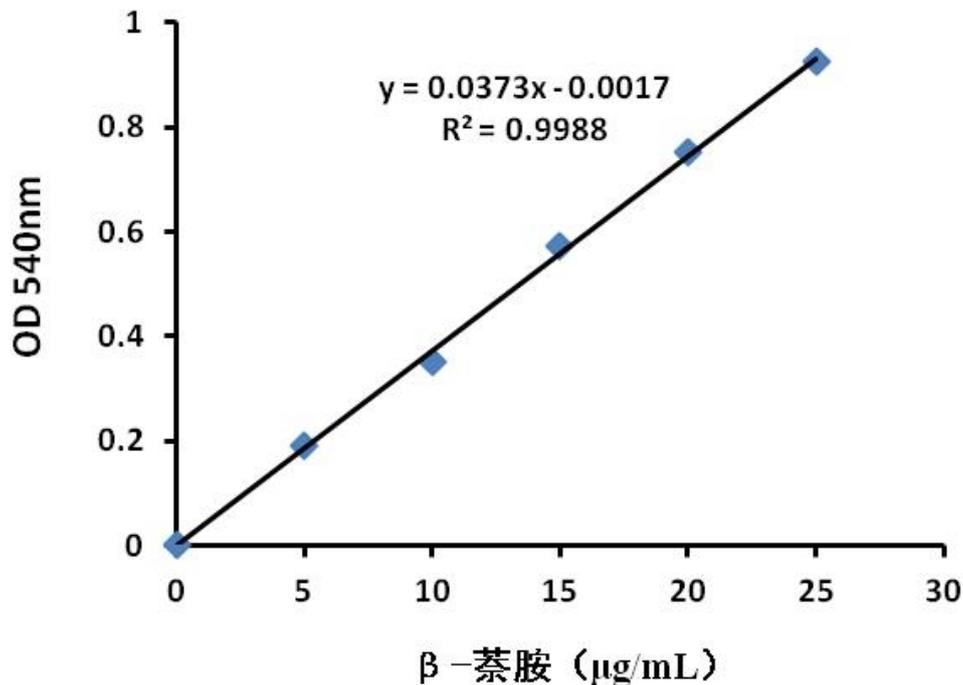
上清液	80	80
试剂三	80	80
试剂四	80	80
混匀，10min 后，于 540nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】:1.若 ΔA 值在零附近徘徊，可在 37°C 孵育阶段延长反应时间 T(如增至 3h 或更长)，或增加土壤样本量 W (如增至 0.2g)，则改变后的反应时间 T 和 W 需代入公式重新计算。

2. 若 A 测定的值大于 1.8，可用乙醇对整个红色显色反应液进行稀释，则稀释倍数 D 需代入公式参与计算。

结果计算:

1、**标准曲线方程**: $y = 0.0373x - 0.0017$, x 是标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$) , y 是 ΔA 。



2、酶活定义：37°C条件下，每克土样每小时释放出 1μg 的β-萘胺为一个酶活力单位。

土壤芳基酰胺酶活性(μg/h/g 土样)=(ΔA+0.0017)÷0.0373×V1÷W÷T

=13.4×(ΔA+0.0017)÷W

V1---孵育阶段的反应总体积，1mL； T---反应时间，2h； W---样本质量，g；

附：标准曲线制作过程：

1 制备标准品母液 (2.5mg/mL)：标准品用 1mL 乙醇溶解。(母液需在两天内用)。

2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 5, 10, 15, 20, 25. μg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。