

## 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 (分光法 24 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 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加 15mL 试剂一，充分溶解备用。
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂

### 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、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 可见分光光度计预热 30 min，调节波长到 405 nm，蒸馏水调零。
- ② 在离心管中依次加入下列试剂：

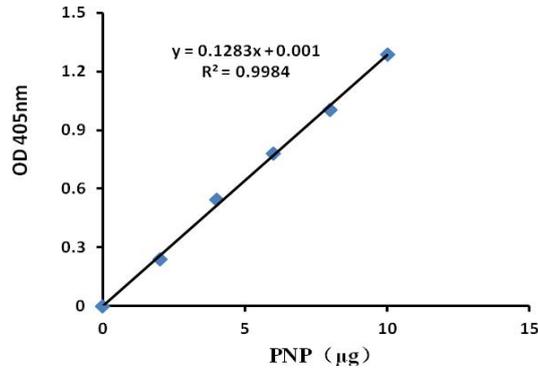
试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	对照管
土壤（g）	0.1g	0.1g
试剂一		500
试剂二	500	
迅速混匀，37°C保温 1h（间隔 15min 振荡混匀一次）		
试剂三	300	300
混匀，12000rpm，离心 5min，取出全部上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个自身对照）。		

- 【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 $\Delta A$  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： $y = 0.1283x + 0.001$ ； $x$  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。

$$S-\alpha\text{-Afa}(\mu\text{g/h/g 土样}) = [(\Delta A - 0.001) \div 0.1283] \div W \div T \times D = 7.8 \times (\Delta A - 0.001) \div W \times D$$

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+ $490\mu\text{L}$  试剂一+ $300\mu\text{L}$  试剂三，混匀，全部上清液转移至  $1\text{mL}$  玻璃比色皿（光径  $1\text{cm}$ ）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。