

## 土壤 $\alpha$ -半乳糖苷酶 (S- $\alpha$ -GAL) 活性

规格：微量法 48 样

编号：ml300807

检测原理：荧光法

**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×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

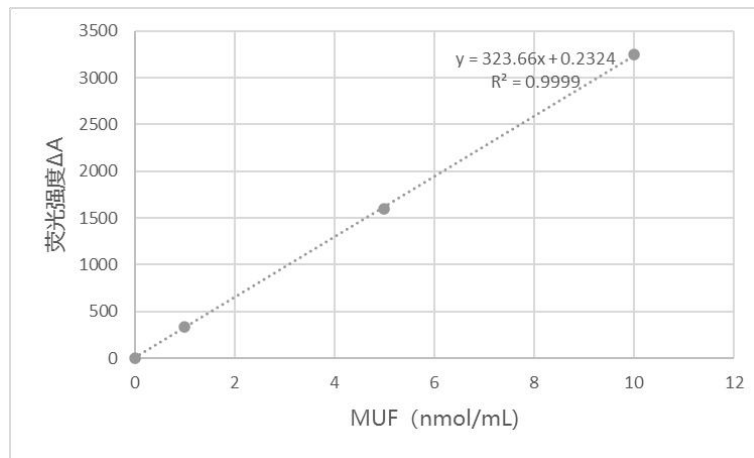
试剂名称	测定管	空白管
震荡条件下取匀待测液 (μL)	200	-
蒸馏水 (μL)	-	200
试剂二 (μL)	200	200

混匀, 30°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:  $y = 323.66x + 0.2324$ ,  $R^2 = 0.9999$

x: 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  $y=kx+b$ ;