

## 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

(货号:BP10085F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

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:

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度     | 注意事项                                                                     |
|------|-------------|----------|--------------------------------------------------------------------------|
| 试剂一  | 液体 30mL×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）；<br>2. 加入 15mL 试剂一, 充分溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂三  | 液体 15mL×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；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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 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:

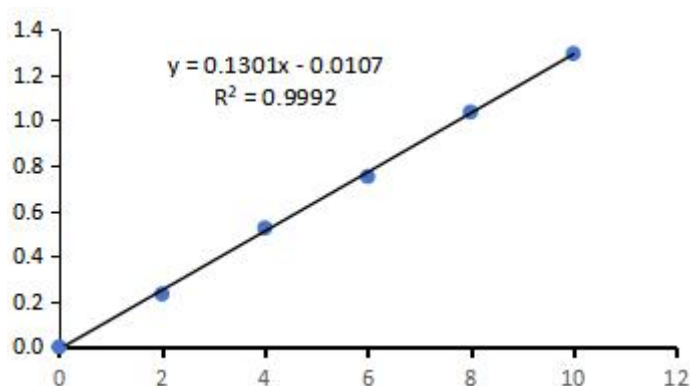
| 试剂组分 (μL)                             | 测定管  | 对照管  |
|---------------------------------------|------|------|
| 土壤 (g)                                | 0.1g | 0.1g |
| 试剂一                                   |      | 500  |
| 试剂二                                   | 500  |      |
| 迅速混匀, 37℃保温 1h (间隔 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： $y = 0.1301x - 0.0107$ ；x 是标准品 PNP 质量（ $\mu\text{g}$ ），y 是  $\Delta A$ 。



2、活性定义：在 37°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。

$$S-\alpha\text{-Afa}(\mu\text{g/h/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0107) \div 0.1301] \div W \div T \times D = 7.7 \times (\Delta A + 0.0107) \div W \times D$$

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 向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水溶解，若有结晶析出，需 37°C 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。

2 标品稀释参照表如下：

| 标品浓度<br>mg/mL | 0   | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1   |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品稀释液<br>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 ( $\mu\text{L}$ ) | 标准管 | 0 浓度管（仅做一次） |
|------------------------|-----|-------------|
| 标品                     | 10  |             |

|                                                                           |     |     |
|---------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 蒸馏水                                                                       |     | 10  |
| 试剂一                                                                       | 490 | 490 |
| 试剂三                                                                       | 300 | 300 |
| 混匀，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。 |     |     |