

土壤 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (S-NAG) 试剂盒说明书

(货号: BP10109W-96 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

土壤 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAG, EC 3.2.1.52) 是溶酶体中的一种酸性水解酶, 由土壤微生物分泌, 该酶的活性变化与机体某些病理状态密切相关。

土壤 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (S-NAG) 分解 4-硝基酚-β-N-乙酰氨基葡萄糖生成对-硝基苯酚 (PNP), 在 405nm 处检测该产物的升高速率, 来计算 S-NAG 活力大小。

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	粉剂 2 瓶	-20℃避光保存	每瓶: 1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 7.6mL 蒸馏水, 充分溶解备用, 用不完的试剂仍-20℃保存;
试剂二	液体 80mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 80mL×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、样本的制备:

取新鲜土样或干土 (风干或者 37 度烘箱风干), 先粗研磨, 过 40 目筛网备用。

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

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

② 在 EP 管中依次加入:

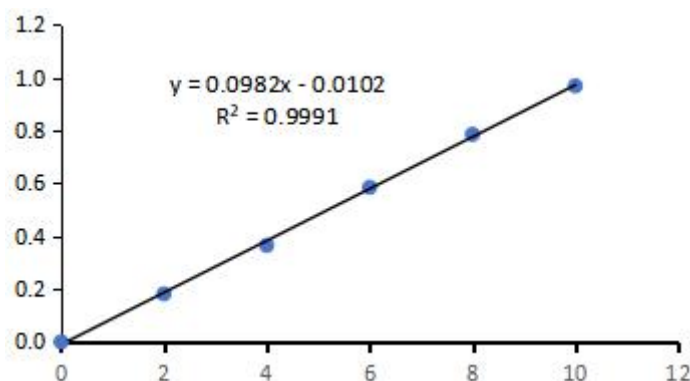
试剂组分 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
土样 (g)	0.05	0.05	

试剂一	150		150
蒸馏水		150	
试剂二	300	300	300
混匀，37℃（水浴锅或恒温培养箱）振荡反应 1h			
试剂三	350	350	350
混匀，12000rpm，离心 10min，取上清液 200μL 于 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ （每个测定管需设一个对照管）。			

- 【注】：1.若 ΔA 在零附近徘徊，可延长 37℃的孵育时间 T（如增至 4 小时或更长），或增加土样质量 W（如增至 0.2g）。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。
- 2.若测定管 A 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1.5，可缩短 37℃的孵育时间 T（如减至 0.5 小时或更短）。则改变后 T 需代入计算公式重新计算。或对最后一步的待检测上清液（包括测定管、对照管和空白管）同时用蒸馏水进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

五、结果计算：

- 1、标准曲线： $y = 0.0982x - 0.0102$ ；x 为标准品质量（μg），y 为吸光值 ΔA 。



- 2、单位定义：每小时每克土样中产生 1nmol 对-硝基苯酚（PNP）定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{S-NAG 活力}(\text{nmol/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0102) \div 0.0982 \div \text{Mr} \times 10^3 \div W \div T \times D \\ &= 73.2 \times (\Delta A + 0.0102) \div W \times D \end{aligned}$$

T---反应时间，1h；

W---实际称取土样质量，g；

Mr--- PNP 相对分子质量，139.11；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水，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, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/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：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
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	20	
蒸馏水	130	150
试剂二	300	300
试剂三	350	350
混匀，取 200μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		