

土壤 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶测试盒说明书

| 产品货号 | 产品名称 | 包装规格 | 测定方法 |
|-----------|-------------------------|------|------|
| SMHB6-C24 | 土壤N-乙酰葡萄糖苷酶 (S-NAG) 试剂盒 | 24T | 常量法 |
| SMHB6-C48 | | 48T | |

一、测定意义：

土壤 N-乙酰葡萄糖苷酶 (S-NAG) 是土壤微生物分泌的溶酶体中的一种酸性水解酶, 与几丁质的转化起到重要作用。

二、测定原理：

以对硝基苯基-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷为底物, 水解生成对硝基酚, 产物显黄色, 在 400nm 有特征吸收峰。

三、试剂盒组成：

| 试剂名称 | 试剂装量 (24T) | 试剂装量 (48T) | 保存条件 |
|------------------------------|------------|------------|---------|
| 甲苯 | 自备 | 自备 | 常温保存 |
| 试剂一 | 35mL×1 瓶 | 60mL×1 瓶 | 2-8℃ 保存 |
| 试剂二 | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×2 瓶 | -20℃ 保存 |
| 试剂二应用液配制：每瓶粉剂加入试剂一 3mL，充分溶解。 | | | |
| 试剂三 | 10mL×1 瓶 | 105mL×1 瓶 | 2-8℃ 保存 |
| 试剂四 | 60mL×1 瓶 | 100mL×1 瓶 | 2-8℃ 保存 |
| 标准品 (1mg/mL) | 1mL×1 支 | 1mL×2 支 | 2-8℃ 保存 |

四、操作步骤：

一、样本前处理

新鲜土样自然风干或者 37℃ 烘箱风干, 过 30-50 目筛。

二、操作步骤

1、培养反应：

| | 测定管 | 对照管 |
|---------------------------|-----|-----|
| 土样 (g) | 0.1 | 0.1 |
| 甲苯 (μ L) | 50 | 50 |
| 震荡混匀, 使土样全部湿润, 室温静置 15min | | |
| 试剂一 (μ L) | 500 | 500 |
| 蒸馏水 (μ L) | - | 100 |
| 试剂二 (μ L) | 100 | - |
| 混匀, 37℃ 孵育 3h | | |
| 试剂三 (μ L) | 100 | 100 |

混匀，10000 转/min 常温离心 10min，取上清液备用。

2、显色反应：（标准品稀释详见附录 I）

| | 测定管 | 对照管 | 标准管 |
|---------------------------|-----|-----|-----|
| 上清液（ μL ） | 100 | 100 | - |
| 不同浓度的标准品（ μL ） | - | - | 100 |
| 试剂四（ μL ） | 900 | 900 | 900 |

混匀，静置 10min，波长 400nm，1cm 光径，蒸馏水调零，测定各管吸光度值。

注：每个待测样本需设定一个测定管和一个对照管；

五、单位定义与计算：

单位定义：每小时每克风干土壤中产生 $1\mu\text{g}$ 对硝基酚为一个酶活力单位

计算公式：根据标准曲线，将吸光度值带入标曲计算出上清液中浓度 Y ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

$$\text{S-NAG}(\text{U/g 土样}) = (Y_{\text{测定管}} - Y_{\text{对照管}}) \times V_{\text{反应}} \div W \div T$$

T：反应时间，3h；

$V_{\text{反应}}$ ：反应液体积，0.7mL；

W：样本质量，0.1g。

六、注意事项：

- 1、比色时，溶液呈现淡黄色，在 2h 内保持稳定。
- 2、不同土壤样本的 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶差异较大，根据样本活性可以适当增加或者减少称取样本重量，也可增加反应时间。
- 3、甲苯易挥发，操作时候宜在通风橱中进行。

附录 I：标准曲线的制备

1、前处理：

将 1mg/mL 的标准品用双蒸水稀释成 0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μ g/mL 标准液进行标准曲线的制备。

2、操作表：

| | | | | | | | |
|---------------------|-----|-------|------|------|-----|-----|-----|
| 标准品浓度 (μ g/mL) | 0 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 |
| 标准品 (μ L) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 试剂四 (μ L) | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 |

混匀，静置 10min，波长 400nm，1cm 光径，蒸馏水调零，测定各管吸光度值。

2、测定结果：

| 标准品浓度 (μ g/mL) | 吸光度值 | 绝对吸光度值 |
|---------------------|-------|--------|
| 0 | 0.002 | 0.000 |
| 3.125 | 0.040 | 0.038 |
| 6.25 | 0.078 | 0.076 |
| 12.5 | 0.158 | 0.156 |
| 25 | 0.303 | 0.301 |
| 50 | 0.586 | 0.584 |
| 100 | 1.211 | 1.209 |

土壤-NAG标准曲线

$y = 83.136x + 0.0472$
 $R^2 = 0.9997$

