土壤 N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶（S-NAG）试剂盒说明书

（货号：G0321W 微板法 48 样）

一、产品简介：

土壤 N-乙酰-β-D-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-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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 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 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅或恒温培养箱、可调式移液器、天平。

四、土壤 N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶（S-NAG）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；土壤过粗细两次筛，保证取样的均匀细腻；

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm。

② 在 EP 管中依次加入：

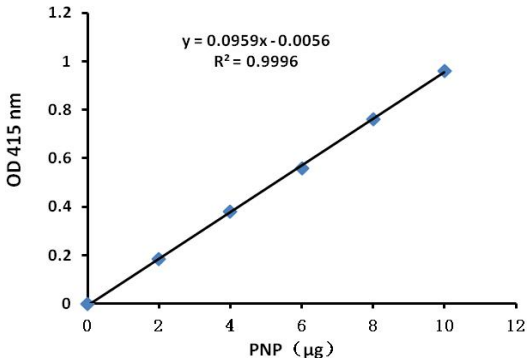
试剂名称（μL）	测定管	对照管	空白管（仅做一次）
土样（g）	0.05	0.05	
试剂一	150		150
蒸馏水		150	
试剂二	300	300	300
混匀， 37℃（水浴锅或恒温培养箱）振荡反应 1h			
试剂三	350	350	350
混匀，12000rpm，离心 10min，取上清液 200μL 于 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值 A，△A=A 测定-A 对照-A 空白（每个测定管需设一个对照管）。			

【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△A 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 = 0.0959x - 0.0056；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。

S-NAG 活力(nmol/h/g 土样)=(ΔA+0.0056)÷0.0959÷Mr×10^3÷W÷T×D

=75×(ΔA+0.0056) ÷W×D

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：

1 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水。

2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 在 EP 管中依次加入：20μL 标准品+130μL 蒸馏水+300μL 试剂二+350μL 试剂三，混匀，取 200μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值。

4 根据结果制作标准曲线。