

土壤 β -1,3 葡聚糖酶 (S- β -1,3-GA) 试剂盒说明书

(货号: G0359W 微板法 48 样)

一、产品简介:

土壤 β -1,3-GA 是一种存在于土壤环境中的水解酶,主要来自土壤中的微生物(如细菌、放线菌、真菌)和植物根系。它能够特异性地催化真菌细胞壁的重要成分—— β -1,3 葡聚糖的水解,在土壤生态和农业实践中具有重要的功能。

本试剂盒采用 DNS 比色法,土壤 β -1,3-GA 水解昆布多糖的 β -1,3-葡萄糖苷键,产生还原末端。利用 3,5 二硝基水杨酸测定还原糖的量,在 540nm 有特征光吸收,在一定范围内 540nm 光吸收增加速率与土壤蔗糖酶活性成正比。

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 \times 1 瓶 | 4 $^{\circ}$ C 保存 | 临用前用 30mL 试剂二混匀,备用 |
| 试剂二 | 液体 80 mL \times 1 瓶 | 4 $^{\circ}$ C 保存 | |
| 试剂三 | 液体 25mL \times 1 瓶 | 4 $^{\circ}$ C 保存 | |
| 标准品 | 粉剂 mg \times 1 支 | 4 $^{\circ}$ C 保存 | 若重新做标曲,则用到该试剂 |

三、所需的仪器和用品:

96 孔板、酶标仪、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、蒸馏水、甲苯。

四、土壤 β -1,3 葡聚糖酶 (S- β -1,3-GA) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

取新鲜土样或 37 度烘箱风干,先粗研磨,过 40 目筛网,备用。

2、上机检测:

① 培养:在 EP 管依次加入:

| 试剂 (μ L) | 测定管 | 对照管 |
|--|------------------|------------------|
| 土样 (g) | 0.1g 鲜土/0.03g 干土 | 0.1g 鲜土/0.03g 干土 |
| 甲苯 | 30 | 30 |
| 试剂一 | 500 | |
| 试剂二 | | 500 |
| 混匀,于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅或恒温培养箱中孵育 24 小时; 12000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 5min, 取上清液待测。 | | |

② 打开酶标仪,调节波长为 540nm。

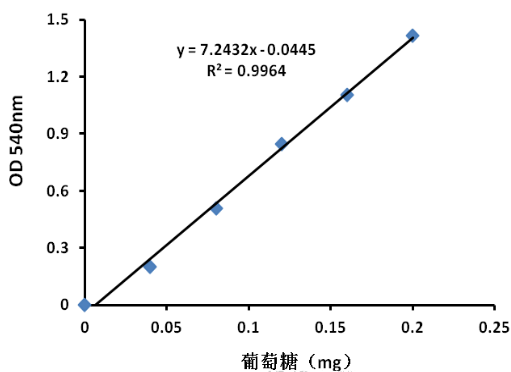
③ 显色反应:在 EP 管中依次加入(先检测 2-5 个样本,参看注意事项,依据 ΔA 判定上清液是否稀释或增加):

| 试剂 (μ L) | 测定管 | 对照管 |
|--|-----|-----|
| 上清液 | 200 | 200 |
| 试剂三 | 200 | 200 |
| 混匀,95 $^{\circ}$ C 水浴 5min (可用封口膜缠紧,以防止水分散失), 取出后流水冷却至室温。 | | |
| 蒸馏水 | 500 | 500 |
| 取 200 μ L 于 96 孔板中,540nm 处分别读取吸光值。 | | |

$\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管 (每个测定管需设一个对照管)。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 7.2432x - 0.0445$; x 为标准品质量 (mg), y 为 ΔA 。



2、酶活性定义: 每天每克土样中产生 1mg 葡萄糖定义为一个酶活单位。

$$S\text{-}\beta\text{-1,3-GA 活力(mg/d/g 土样)} = [(\Delta A + 0.0445) \div 7.2432 \times (V \div V_1)] \div W \div T \times D$$

$$= 0.37 \times (\Delta A + 0.0445) \div W \times D$$

V---反应总体积: 530 μ L;

V1---显色反应中上清液体积: 200 μ L;

T---反应时间, 24h=1d;

W---土壤样本实际取样量, g;

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): 从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中, 再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的葡萄糖 (母液需在两天内用且 -20 $^{\circ}$ C 保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段加样体系操作, 200 μ L 上清液换成标准品, 以标准品的质量为横坐标, 吸光值为纵坐标, 即可制作标准曲线。