

## 土壤 N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶

### (Solid-N-acetyl-β-D-glucosidase, S-NAG) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

**注 意：**正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

**测定意义：**

S-NAG 是溶酶体中的一种酸性水解酶，由土壤微生物分泌。S-NAG 活性变化与机体某些病理状态密切相关。

**测定原理：**

S-NAG 分解 β-N-乙酰氨基葡萄糖苷生成对-硝基苯酚，后者在 400nm 有最大吸收峰，通过测定吸光值升高速率来计算 NAG 活性。

**自备用品：**

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、甲苯（不允许快递）和蒸馏水。

**试剂组成和配制：**

试剂一：甲苯 5mL×1 瓶，4℃ 保存；（自备）

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；临用前加入 10mL 蒸馏水，充分溶解备用，用不完的试剂仍-20℃ 保存；

试剂三：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂四：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存；

**样品处理：**

新鲜土样自然风干或 37 度烘箱风干，过 30~50 目筛。

**测定步骤：**

1、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零。

2、 加样表

| 试剂名称     | 测定管          | 对照管            |
|----------|--------------|----------------|
| 风干土样 (g) | 0.02         | 0.02           |
| 试剂一 (μL) | 10           | 10             |
|          | 室温振荡混匀 15min | 90℃ 振荡混匀 15min |
| 试剂二 (μL) | 130          |                |
| 蒸馏水      |              | 130            |
| 试剂三 (μL) | 160          | 160            |

混匀， 37℃ 振荡反应 1h 后，90℃ 水浴 5min（盖紧，防止水分散失），流水冷却，

10000g 25℃ 离心 10min，取上清液（在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂）

|          |    |    |
|----------|----|----|
| 上清液 (μL) | 70 | 70 |
|----------|----|----|

|          |     |     |
|----------|-----|-----|
| 试剂四 (μL) | 130 | 130 |
|----------|-----|-----|

充分混匀，室温静置 2min 后，400nm 处测定吸光值 A，计算  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个对照管。

**S-NAG 活力计算：**

**a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下**

标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.00645x - 0.0054$ ；x 为标准品浓度 (μmol/L)，y 为吸光值。

单位的定义：每天每 g 土样中产生 1 μmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

S-NAG 活力 (μmol/d/g 土样) =  $(\Delta A + 0.0054) \div 0.00645 \times V_{\text{反应}} \div W \div T = 55.81 \times (\Delta A + 0.0054)$

T: 反应时间, 1h=1/24d; V 反应: 反应体系总体积:  $3 \times 10^{-4}$  L; W: 样本质量, 0.02g。

**b. 用 96 孔板测定的计算公式如下**

标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.0043x - 0.0054$ ；x 为标准品浓度 (μmol/L)，y 为吸光值。

单位的定义：每天每 g 土样中产生 1 μmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

S-NAG 活力 (μmol/d/g 土样) =  $(\Delta A + 0.0054) \div 0.0043 \times V_{\text{反应}} \div W \div T = 83.72 \times (\Delta A + 0.0054)$

T: 反应时间, 1h=1/24d; V 反应: 反应体系总体积:  $3 \times 10^{-4}$  L; W: 样本质量, 0.02g。