

土壤甘氨酸氨基肽酶(Solid-Glycine Aminopeptidase,S-GAP)试剂盒

分 光 法    2    4    样

产 品 简 介:

土壤甘氨酸氨基肽酶（S-GAP）是一类能水解肽链 N-末端为甘氨酸的酶，由土壤微生物分泌。本试剂盒利用土壤甘氨酸氨基肽酶（S-GAP）分解甘氨酸对硝基苯胺生成对硝基苯胺，该物质在 405nm 有大吸收峰，通过测定吸光值升高速率来计算 S-GAP 活性。

试 剂 盒 组 成 和 配 制:

| 试剂名称 | 规格          | 保存要求   | 备注                              |
|------|-------------|--------|---------------------------------|
| 试剂一  | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                 |
| 试剂二  | 粉剂 mg×1 支   | -20℃保存 | 临用前甩几下，使试剂落入底部，再加 2.7mL 乙醇混匀溶解。 |
| 试剂三  | 液体 20mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                 |
| 标准品  | 粉剂 mg×1 支   | 4℃保存   | 若重新做标曲，则用到该试剂。                  |

所 需 的 仪 器 和 用 品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、台式离心机、恒温振荡培养箱/水浴锅、可调式移液器、天平。

土 壤 甘 氨 酸 氨 基 肽 酶 （S-GAP） 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。

## 2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

| 试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）                                                                                                                                                   | 测定管  | 对照管  | 空白管（仅做一次） |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|-----------|
| 土样（g）                                                                                                                                                                   | 0.05 | 0.05 |           |
| 试剂一                                                                                                                                                                     | 400  | 500  | 400       |
| 试剂二                                                                                                                                                                     | 100  |      | 100       |
| 充分混匀,37℃培养 2 小时(振荡培养或间隔 20min 手动振荡混匀几下)。                                                                                                                                |      |      |           |
| 试剂三                                                                                                                                                                     | 300  | 300  | 300       |
| 混匀，8000rpm 离心 5min（若上清液不澄清可加大离心力），取 700 $\mu\text{L}$ 上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ （每个样本做一个自身对照）。 |      |      |           |

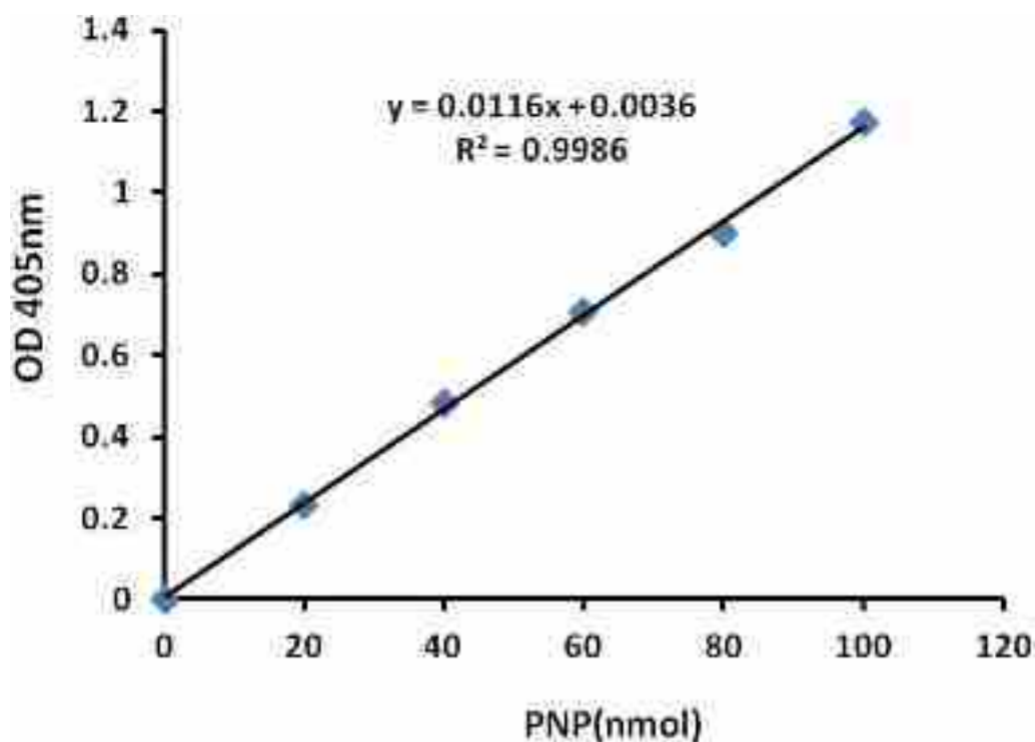
**[注]:** 1. 若 $\Delta A$  较小，可延长 37℃的孵育时间 T（如增至 4 小时或更长），或增加土样质量 W（如增至 0.2g）。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

2. 若测定管 A 值大于 1.5 或 $\Delta A$  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。

## 结果计算:

### 1、标准曲线方程：

$y = 0.0116x + 0.0036$ ; x 为标准品摩尔质量 (nmol), y 为 $\Delta A$ 。



**2、单位定义：**每小时每克土样生成 1 nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$S-LAP(\text{nmol/h/g 土样}) = (\Delta A - 0.0036) \div 0.0116 \div W \div T \times D = 43.1 \times (\Delta A - 0.0036) \div W \times D$$

T---反应时间，2h； 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 (10 $\mu\text{mol/mL}$ )：临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，加入 0.5mL 乙醇，涡旋震荡溶解后再加入 0.5mL 的蒸馏水混匀，得到 10 $\mu\text{mol/mL}$  备用。

2, 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3, 在 EP 管依次加入：50 $\mu\text{L}$  标准品+450 $\mu\text{L}$  试剂一+300 $\mu\text{L}$  试剂三，混匀，取全部液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 下读取吸光值，根据结果制作标准曲线。