

土壤几丁质酶试剂盒说明书

(货号: BP10094F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

多种微生物、动物、植物等都可产生几丁质酶, 土壤中几丁质酶主要水解几丁质多聚体产生 N-乙酰氨基葡萄糖, 该产物进一步与铁氰化钾反应, 于 420nm 处检测, 进而计算得到土壤几丁质酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 18mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉体 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.5mL 盐酸充分混匀溶解后, 再加 1.7mL 蒸馏水混匀备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉体 1 支	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 19mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂六	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、盐酸、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

取新鲜土样或 37℃烘箱风干, 先粗研磨, 过 40 目筛网备用。

2、检测步骤:

① 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 420nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
土样 (g)	0.1g	0.1g
试剂一	300	400

试剂二	100	
混匀, 37°C (恒温培养箱) 孵育 3h, 4000rpm 离心 5min, 取上清。		

③ 在 EP 管中依次加入:

上清液	200	200
试剂三	10	10
试剂四	370	370
混匀, 37°C孵育 1h。		
试剂五	120	120
混匀, 4000rpm 离心 5min, 取上清液待测。		

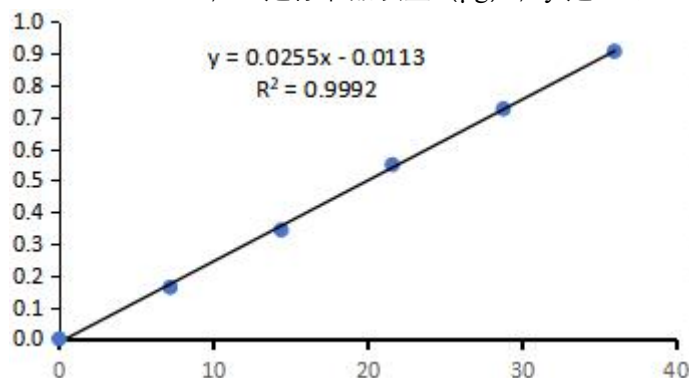
④ 在 EP 管中依次加入:

上清液	360	360
试剂六	480	480
混匀, 95-100°C煮沸 10min, 若有沉淀, 于 12000rpm 室温离心 5min, 取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿中于 420nm 处读取各管吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】若 ΔA 较小, 可以加大样本量 (如增至 0.2g), 或延长 37°C的孵育时间 (由 3h 增加至 5h 或更长), 则改变后的样本重量 W 和反应时间 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0255x - 0.0113$, X 是标准品质量 (μg), y 是 ΔA 。



2、按照样本重量计算:

酶活定义: 每克土壤每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{gN}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\text{土壤几丁质酶活性}(\mu\text{g/h/g 土壤}) = [(\Delta A + 0.0113) \div 0.0255 \times 3.89] \div W \div T$$

$$= 50.8 \times (\Delta A + 0.0113) \div W$$

T---反应时间, 3h;

W---样本质量, g;

3.89---体积系数;

标准品分子量---221.21;

附: 标准曲线制作过程:

- 标准品临用前加 2mL 蒸馏水, 标准品母液浓度为 1mg/mL 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/mL 。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 200uL, 加入 1800uL 蒸馏水, 混匀得到 0.1mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1

mg/mL						
标品稀释液 uL	0	80	160	240	320	400
水 uL	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据第④步骤测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	360	
蒸馏水		360
试剂六	480	480
混匀，95-100°C煮沸 10min，取全部液体至 1mL 玻璃比色皿中于 420nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		