

土壤几丁质酶试剂盒说明书

(货号: BP10094W 微板法 48 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 25mL×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 3mL 盐酸充分混匀溶解后, 再加 3mL 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 2mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂六	液体 20mL×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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 420nm。

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	200	300
试剂二	100	
混匀，37℃（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	150	150
试剂三	10	10
试剂四	15	15
混匀，37℃孵育 0.5h。		
试剂五	50	50
混匀，4000rpm 离心 5min，取上清液待测。		

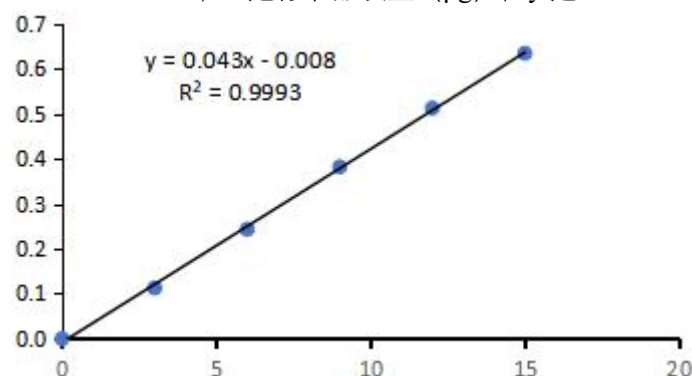
④ 在 EP 管中依次加入：

上清液	150	150
试剂六	200	200
混匀，95-100℃煮沸 10min，若有沉淀，于 12000rpm 室温离心 5min，取 200μL 上清液至 96 孔板中于 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℃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： $y = 0.043x - 0.008$ ，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 1μgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

土壤几丁质酶活性(μg/h/g 土壤)=[$(\Delta A + 0.008) \div 0.043 \times 3$] $\div$ W $\div$ T = 23.3 $\times$ ($\Delta A + 0.008$) $\div$ W

T---反应时间，3h；

W---样本质量，g；

3---体积系数；

标准品分子量---221.21；

附：标准曲线制作过程：

- 1 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。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 0.1mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	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	150	
蒸馏水		150
试剂六	200	200
混匀，95-100℃煮沸 10min，取 200μL 至 96 孔板中于 420nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		