

土壤半纤维素酶/土壤木聚糖酶试剂盒说明书

(货号: BP10102F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

半纤维素酶主要检测木聚糖酶活力, 是将木聚糖降解成低聚糖和木糖的一组酶的总称, 广泛应用于酿造和饲料工业中。

土壤半纤维素酶在酸性环境下能将木聚糖降解成还原性寡糖和单糖, 进一步在沸水浴条件下与 3,5-二硝基水杨酸发生显色反应, 在 540nm 处有特征吸收峰, 反应液颜色的深浅与酶解产生的还原糖量成正比, 通过测定反应液在 540nm 吸光值增加速率, 即可计算该酶活力大小。

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 50mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃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、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:

取新鲜土样或干土 (风干或者 37 度烘箱风干), 先粗研磨, 过 40 目筛网备用。

【注】: 土壤风干, 减少土壤中水分对于实验的干扰; 土壤过筛, 保证取样的均匀细腻;

2、检测步骤:

① 分光光度计预热 30min, 调节波长至 540nm, 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)	0.3	0.3
试剂一	600	900
试剂二	300	
充分混匀, 40℃培养 6 小时 (振荡培养或间隔一段时间手动振荡混匀几下), 12000rpm, 25℃离心 10min, 上清液待用		

③ 显色反应, 在 EP 管中依次加入:

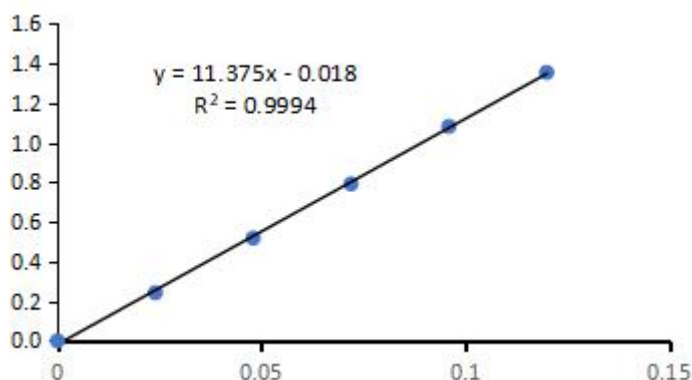
上清液	40	40
试剂三	200	200
混匀, 沸水浴 (95-100℃, 可用封口膜缠紧, 防止水分流失) 5min 后, 冷却至室温,		
蒸馏水	800	800
混匀, 取 800μL 液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于		

540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

- 【注】：1.若 ΔA 较小，可延长 40℃的孵育时间 T（如 24 小时或更长），或增加土样质量 W，或增加③步显色反应步骤中的上清液 V1（如由 40 μ L 增至 240 μ L 或更大，则蒸馏水相应减少）。则改变后的 T 和 W 和 V1 需代入计算公式重新计算。
- 2.若测定管 A 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1，③步显色反应步骤中的上清液可用蒸馏水稀释，则稀释倍数 D 代入公式计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 11.375x - 0.018$ ，x 是标准品质量（mg），y 是 ΔA 。



- 2、酶活定义：PH4.8 条件下，每克土壤每天分解木聚糖产生 1mg 还原糖所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{土壤半纤维素酶活力}(\text{mg/d/g 土样}) = [(\Delta A + 0.018) \div 11.375] \times (V2 \div V1) \div W \div T \times D$$

$$= 7.9 \times (\Delta A + 0.018) \div W \times D$$

V1---显色反应中上清液体积，40 μ L=0.04mL； V2---反应总体积，900 μ L=0.9mL；
T---反应时间，1/4d； W---土壤样本质量，g。
D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存），标准品母液浓度为 5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3 mg/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 600uL，加入 400uL 蒸馏水，混匀得到 3mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.6	1.2	1.8	2.4	3
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 依据显色反应阶段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（ μ L）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	40	

蒸馏水		40
试剂三	200	200
混匀，沸水浴（95-100℃，可用封口膜缠紧，防止水分流失） 5min 后，冷却至室温，		
蒸馏水	800	800
混匀，取 800μL 液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		