

土壤外切-β-1,4-葡聚糖酶（S-CBH）活性测定试剂盒说明书

（货号：BP10106W-96 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

土壤外切-β-1,4-葡聚糖酶又称土壤纤维二糖水解酶（CBH，EC 3.2.1.91）是土壤纤维素酶系的组份之一，该酶作用于β-1,4-糖苷键，每次切下一个纤维二糖（还原糖）分子，本试剂盒采用该酶催化对硝基苯基-β-D-纤维二糖苷生成黄色物质对-硝基苯酚（PNP），该物质在 405nm 有特征光吸收，进而得到土壤外切-β-1,4-葡聚糖酶（S-CBH）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 120mL×1 瓶 液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 4 支	4℃保存	每支： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.4mL 蒸馏水溶解，4 度保存。
试剂三	液体 40mL×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、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm。

② 在 EP 管中依次加入：

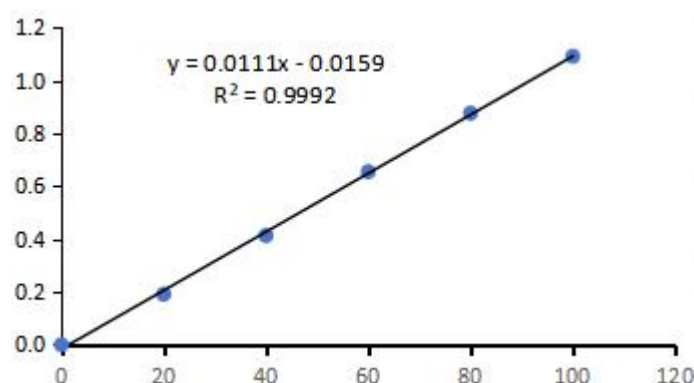
试剂组分（μL）	测定管	对照管	空白管（仅做一次）
土样（g）	0.1	0.1	

试剂一	750	800	750
试剂二	50		50
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	200	200	200
混匀，8000rpm 离心 5min（若上清液不澄清可加大离心力），取 200μL 上清液至 96 孔板中，405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照-A 空白（每个样本做一个自身对照）。			

- 【注】：1.若 ΔA 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 0.3g）。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 ΔA 大于 1.5，可缩短 37℃的孵育时间 T（如减至 0.5 小时或更短），或减少土样质量 W（如减至 0.05g）。则改变后 T 和 W 需代入计算公式重新计算。或对最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。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.0111x - 0.0159$ ；x 为标准品摩尔质量（nmol），y 为 ΔA 。



- 2、单位定义：每小时每克土样中产生 1nmol 对-硝基苯酚（PNP）定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{S-CBH 活力}(\text{nmol/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0159) \div 0.0111 \div W \div T \times D \\ &= 45 \times (\Delta A + 0.0159) \div W \times D \end{aligned}$$

T---反应时间，2h；

W---土壤样本实际取样量，g；

PNP 相对分子质量---139.11。

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解，标准品母液浓度为 10μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2μmol/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 800uL 蒸馏水，混匀得到 2μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
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	50	
蒸馏水		50
试剂一	750	750
试剂三	200	200
混匀，取 200μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		