

土壤纤维素酶（Solid-cellulase, S-CL）活性测定试剂盒说明书

(货号:BP10128W-96 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

纤维素是植物残体进入土壤的碳水化合物的重要组成部分之一。在土壤纤维素酶作用下, 可以催化纤维素水解生成纤维二糖、葡萄糖等还原糖, 所以, 纤维素酶是碳素循环中的一个重要酶。本试剂盒采用 3,5-二硝基水杨酸与终产物还原糖反应生成棕红色物质, 在 540nm 处有特征吸收峰, 进而得到土壤纤维素酶活性。

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	粉体 2 瓶	4℃保存	每瓶: 1. 临用前加入 55mL 试剂二, 可 80℃水浴, 搅拌至溶解, 待用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 110mL×2 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 20mL×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)、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 培养: 在 EP 管依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
土样 (g)	0.3-0.5	0.3-0.5
试剂一	1000	
试剂二		1000
充分混匀, 40℃培养 24 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		

② 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长为 540nm。

③ 显色反应: 在 EP 管中依次加入:

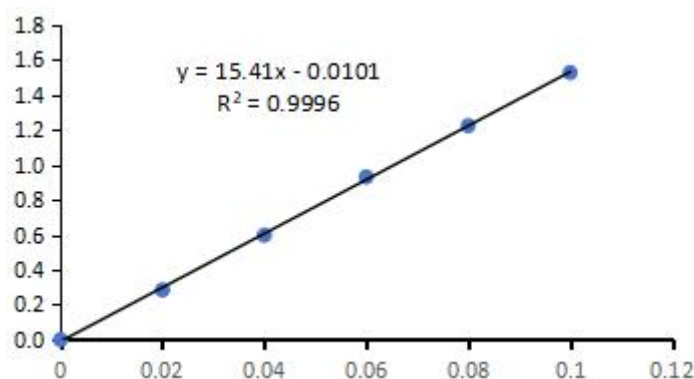
上清液	200	200
试剂三	100	100
混匀, 95℃水浴 5min, 待冷却后 (若液体有浑浊现象, 可室温		

8000rpm 离心 5min 后取上清液测定)，取 200μL 于 96 孔板中，在 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 48 小时或更长），或增加土样质量 W。则改变后的 V1 或土壤重量 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 1，③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： $y = 15.41x - 0.0101$ ；x 为标准品质量（mg），y 为 ΔA 。



- 2、单位定义：每天每克土样中产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤纤维素酶(S-CL)活力}(\mu\text{g/d/g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0101) \div 15.41 \times 10^3 \times (V \div V1)] \div W \div T \\ &= 324.46 \times (\Delta A + 0.0101) \div W \end{aligned}$$

V---反应总体积，1000μL；

V1---显色反应中上清液体积，200μL；

T---反应时间，24h=1d；

W---土壤样本实际取样量，g。

附：标准曲线制作过程：

- 从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中，再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的标准品母液（母液需在两天内用且-20℃保存）。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. mg/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 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
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。						

- 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（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
----------	-----	-------------

标品	200	
蒸馏水		200
试剂三	100	100
混匀，95℃水浴 5min，待冷却后（若液体有浑浊现象，可室温 8000rpm 离心 5min 后取上清液测定），取 200μL 于 96 孔板中，在 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		