

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

(货号:G0308F48 分光法 48 样)

### 一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前加入 60mL 试剂二，可80℃水浴，搅拌至溶解，待用。
试剂二	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

### 三、所需仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、水浴锅或恒温振荡培养箱、可调式移液器、蒸馏水。

### 四、土壤纤维素酶（S-CL）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

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，可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、上机检测：

① 培养：在 EP 管依次加入：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	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 分光光度计预热 30min 以上，调节波长为 540nm，蒸馏水调零。

③ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

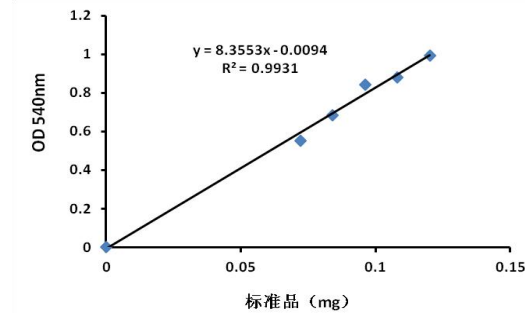
上清液	400	400
试剂三	300	300
混匀，95℃水浴 5min，待冷却后，全部转移到 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，在 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

【注】：1.若 $\Delta A$ 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 1.8 或 $\Delta A$ 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： $y = 8.3553x - 0.0094$ ； $x$  为标准品质量（mg）， $y$  为 $\Delta A$ 。



2、单位定义：每天每克土样中产生  $1\mu\text{g}$  还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤纤维素酶(S-CL)活力}(\mu\text{g/d/g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0094) \div 8.3553 \times 10^3 \times (V \div V_1)] \div W \div T \\ &= 299.2 \times (\Delta A + 0.0094) \div W \end{aligned}$$

V---反应总体积，1000 $\mu\text{L}$ ；

V1---显色反应中上清液体积，400 $\mu\text{L}$ ；

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：

- 1 制备标准品母液（1mg/mL）：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（母液需在两天内用且-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.18, 0.21, 0.24, 0.27, 0.3. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在显色反应阶段，按照测定管加样表操作，依据结果即可制作标准曲线。