

土壤半纤维素酶/土壤木聚糖酶试剂盒说明书

(货号: G0326F 分光法 24 样)

一、产品简介:

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:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-------------|------|---------------|
| 试剂一 | 液体 50mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂二 | 液体 8mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂三 | 液体 10mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 标准品 | 粉剂×1 支 | 4℃保存 | 若重新做标曲,则用到该试剂 |

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、可调式移液器、天平、常温离心机、空气浴(恒温震荡仪)、水浴锅。

四、土壤半纤维素酶活性测定:

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,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 可见分光光度计预热 30min,调节波长至 540nm,蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

| 试剂名称(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, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。 | | |

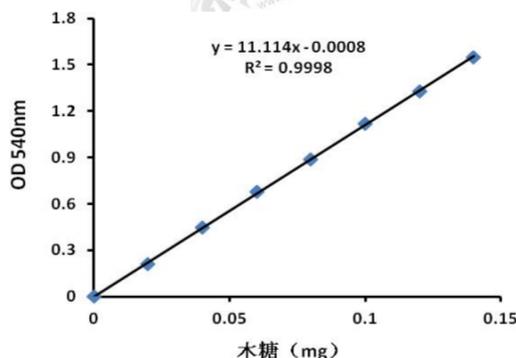
【注】:1.若 ΔA 较小,可延长 40℃的孵育时间 T(如 24 小时或更长),或增加土样质

量 W，或增加③步显色反应步骤中的上清液 V1（如由 40μL 增至 240μL 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： $y=11.114x-0.0008$ ，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。

$$\text{土壤半纤维素酶活力(mg/d/g 土样)} = [(\Delta A + 0.0008) \div 11.114] \times (V2 \div V1) \div W \div T \times D$$

$$= 8.1 \times (\Delta A + 0.0008) \div W \times D$$

V1---显色反应中上清液体积，40μL=0.04mL； V2---反应总体积，900μL=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 制备标准品母液（5mg/mL）：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）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3. mg/mL。也可根据实际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。