

## 土壤几丁质酶试剂盒说明书

(货号: G0335W 微板法 48 样)

### 一、产品简介:

多种微生物、动物、植物等都可产生几丁质酶,土壤中几丁质酶主要水解几丁质多聚体产生 N-乙酰氨基葡萄糖,该产物进一步与铁氰化钾反应,于 420nm 处检测,进而计算得到土壤几丁质酶活性大小。

### 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 25mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加 3mL 盐酸充分混匀溶解后,再加 3mL 蒸馏水混匀备用。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 2mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	粉体 g×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加 24mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉剂×1 支	4°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、天平、水浴锅、低温离心机、盐酸、蒸馏水。

### 四、土壤几丁质酶活性测定:

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 37°C烘箱风干,先粗研磨,过 40 目筛网备用。

#### 2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 420nm。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
土样 (g)	0.1g	0.1g
试剂一	200	300
试剂二	100	

混匀, 37°C (恒温培养箱) 孵育 3h, 4000rpm 离心 5min, 取上清。

③ 在 EP 管中依次加入:

上清液	150	150
试剂三	10	10
试剂四	15	15

混匀, 37°C孵育 0.5h。

试剂五	50	50
-----	----	----

混匀, 4000rpm 离心 5min, 取上清液待测。

④在 EP 管中依次加入：

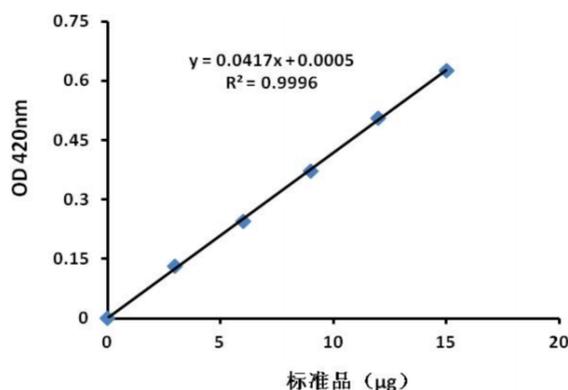
上清液	150	150
试剂六	200	200

混匀,95-100°C煮沸 10min,若有沉淀,于 12000rpm 室温离心 5min,  
取 200 $\mu$ L 上清液至 96 孔板中于 420nm 处读取各管吸光值 A,  
 $\Delta A = A$  对照 - A 测定 (每个样本做一个自身对照)。

【注】若 $\Delta A$ 较小,可以加大样本量(如增至 0.2g),或延长 37°C的孵育时间(由 3h 增加至 5h 或更长),则改变后的样本重量 W 和反应时间 T 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0417x + 0.0005$ , x 是标准品质量 ( $\mu$ g), y 是 $\Delta A$ 。



2、按照样本重量计算：

酶活定义：每克土壤每小时分解几丁质产生 1 $\mu$ gN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

土壤几丁质酶活性( $\mu$ g/h/g 土壤)=[ $(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 3$ ] $\div W \div T = 24 \times (\Delta A - 0.0005) \div W$

T---反应时间, 3h;

W---样本质量, g;

3---体积系数;

标准品分子量---221.21;

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL)：标准品临用前加 2mL 蒸馏水, 即为 1mg/mL。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据第④步骤的加样体系：150 $\mu$ L 标准品+200 $\mu$ L 试剂六, 混匀, 95-100°C煮沸 10min, 取 200 $\mu$ L 至 96 孔板中于 420nm 处读取各管吸光值 A, 标准品的质量作为横坐标, 0 mg/mL 对应的 A 值减去各浓度标准品对应的 A 之差作为纵坐标, 即可得出标准曲线。