

土壤几丁质酶试剂盒说明书

(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。		

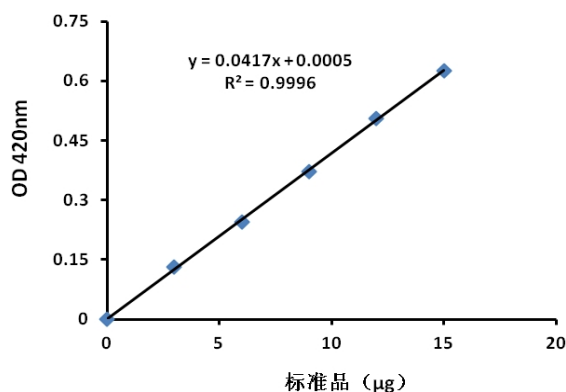
④在 EP 管中依次加入：

上清液	150	150
试剂六	200	200
混匀,95-100℃煮沸 10min,若有沉淀,于 12000rpm 室温离心 5min, 取 200μL 上清液至 96 孔板中于 420nm 处读取各管吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】若 ΔA 较小,可以加大样本量(如增至 0.2g),或延长 37℃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 (μg), y 是 ΔA 。



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 $1\mu\text{g}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

土壤几丁质酶活性($\mu\text{g}/\text{h}/\text{g}$ 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 ($1\text{mg}/\text{mL}$)：标准品临用前加 2mL 蒸馏水, 即为 $1\text{mg}/\text{mL}$ 。
- 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, $0.1\text{mg}/\text{mL}$ 。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： $150\mu\text{L}$ 标准品+ $200\mu\text{L}$ 试剂六, 混匀, $95-100^\circ\text{C}$ 煮沸 10min, 取 $200\mu\text{L}$ 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。