

土壤半纤维素酶/土壤木聚糖酶试剂盒说明书

(微板法 48 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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 20mL×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：

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min，调节波长至 540nm。

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：

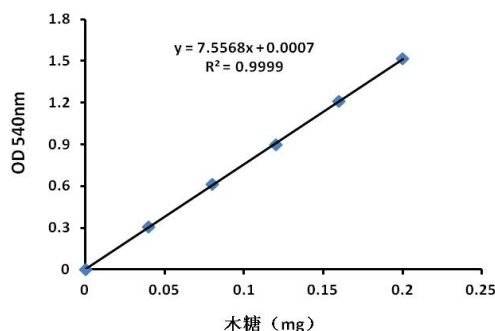
上清液	40	40
试剂三	200	200
混匀，沸水浴（95-100℃，可用封口膜缠紧，防止水分流失）5min 后，冷却至室温。		
蒸馏水	800	800
混匀，若浑浊则 8000rpm 室温离心 5min，取 200μL 液体至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

【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 或更多，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: $y=7.5568x+0.0007$, 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。

$$\begin{aligned} \text{土壤半纤维素酶活力}(\text{mg/d/g 土样}) &= [(\Delta A - 0.0007) \div 7.5568] \times (V2 \div V1) \div W \div T \times D \\ &= 12 \times (\Delta A - 0.0007) \div W \times D \end{aligned}$$

V1---显色反应中上清液体积, 40 μL =0.04mL; V2---反应总体积, 900 μL =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 $^{\circ}\text{C}$ 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 1, 2, 3, 4, 5. 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。