

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

（微板法 96 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×2 瓶	4℃保存	临用前每瓶加入 55mL 试剂二，可 80℃水浴，搅拌至溶解，待用。
试剂二	液体 110mL×2 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 20mL×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：

酶标仪、96 孔板、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，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（ μL ）	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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长为 540nm。

③ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

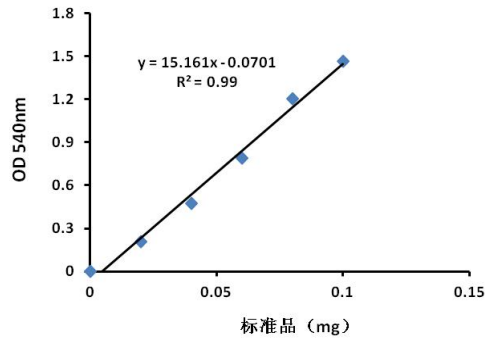
上清液	200	200
试剂三	100	100
混匀，95℃水浴 5min，待冷却后，取 200 μL 于 96 孔板中，在 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

【注】：1.若 ΔA 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 1.5 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： $y = 15.161x - 0.0701$ ； x 为标准品质量（mg）， y 为 ΔA 。



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。

$$\begin{aligned} \text{土壤纤维素酶(S-CL)活力}(\mu\text{g/d/g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0701) \div 15.161 \times 10^3 \times (V \div V1)] \div W \div T \\ &= 329.8 \times (\Delta A + 0.0701) \div W \end{aligned}$$

V---反应总体积，1000 μL ；

V1---显色反应中上清液体积，200 μL ；

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）：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, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. 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。