

土壤半纤维素酶/土壤木聚糖酶试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TR062 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°C保存	
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
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:

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°C 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°C 离心 10min, 上清液待用		

③ 显色反应, 在 EP 管中依次加入:

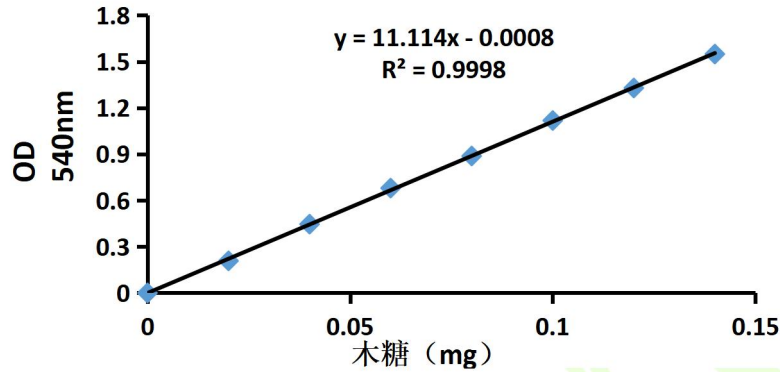
上清液	40	40
试剂三	200	200
混匀, 沸水浴 (95-100°C, 可用封口膜缠紧, 防止水分流失) 5min 后, 冷却至室温,		
蒸馏水	800	800
混匀, 取 800μL 液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

【注】: 1. 若 ΔA 较小, 可延长 40°C 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。

$$\begin{aligned} \text{土壤半纤维素酶活力}(\text{mg/d/g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0008) \div 11.114] \times (V2 \div V1) \div W \div T \times D \\ &= 8.1 \times (\Delta A + 0.0008) \div W \times D \end{aligned}$$

V1---显色反应中上清液体积, 40 μ L=0.04mL; V2---反应总体积, 900 μ L=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 $^{\circ}$ C 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。