

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

(货号:ADS-F-TR004 分光法 24 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 1 瓶	4°C 保存	临用前加入 30mL 试剂二，可 80°C 水浴，搅拌至溶解，待用。
试剂二	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 15mL×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、所需仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、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，可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°C 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°C 离心 10min，上清液待用		

② 分光光度计预热 30min 以上，调节波长为 540nm，蒸馏水调零。

③ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

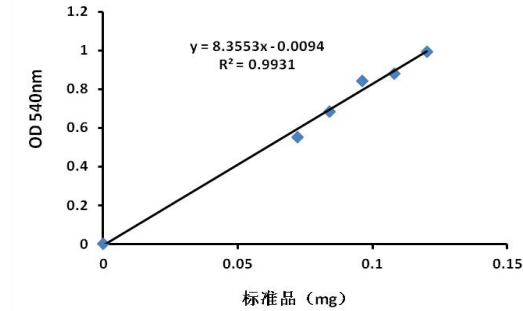
上清液	400	400
试剂三	300	300
混匀，95°C 水浴 5min，待冷却后（若液体有浑浊现象，可室温 8000rpm 离心 5min 后取上清液测定），全部转移到 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，在 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

【注】：1.若 ΔA 较小，可延长 40°C 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 1.8 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: $y = 8.3553x - 0.0094$; 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。

$$\begin{aligned} \text{土壤纤维素酶(S-CL)活力}(\mu\text{g/d/g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0094) \div 8.3553 \times 10^3 \times (V \div V_1)] \div W \div T \\ &= 299.2 \times (\Delta A + 0.0094) \div W \end{aligned}$$

V---反应总体积, $1000\mu\text{L}$;

V_1 ---显色反应中上清液体积, $400\mu\text{L}$;

T---反应时间, $24\text{h}=1\text{d}$;

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): 从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中, 再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的标准品 (母液需在两天内用且 -20°C 保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: $0, 0.18, 0.21, 0.24, 0.27, 0.3. \text{mg/mL}$ 。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。