

土壤外切-β-1,4-葡聚糖酶（S-CBH）活性测定试剂盒说明书

(货号:ADS-F-TR049-48 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

土壤外切-β-1,4-葡聚糖酶又称土壤纤维二糖水解酶 (CBH, EC 3.2.1.91) 是土壤纤维素酶系的组份之一, 该酶作用于β-1,4-糖苷键, 每次切下一个纤维二糖 (还原糖) 分子, 本试剂盒采用该酶催化对硝基苯基-β-D-纤维二糖苷生成黄色物质对-硝基苯酚 (PNP), 该物质在 405nm 有特征光吸收, 进而得到土壤外切-β-1,4-葡聚糖酶 (S-CBH) 活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 90mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 2 支	4℃保存	每支: 1. 临用前加入 1.5mL 蒸馏水溶解; 2. 4 度保存。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
土样 (g)	0.1	0.1	
试剂一	750	800	750
试剂二	50		50
充分混匀, 37℃培养 2 小时 (振荡培养或间隔 20min 手动振荡混匀几下)			
试剂三	200	200	200
混匀, 8000rpm 离心 5min (若上清液不澄清可加大离心力), 取 700μL 上清液至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 405nm 下读取			

吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ (每个样本做一个自身对照)。

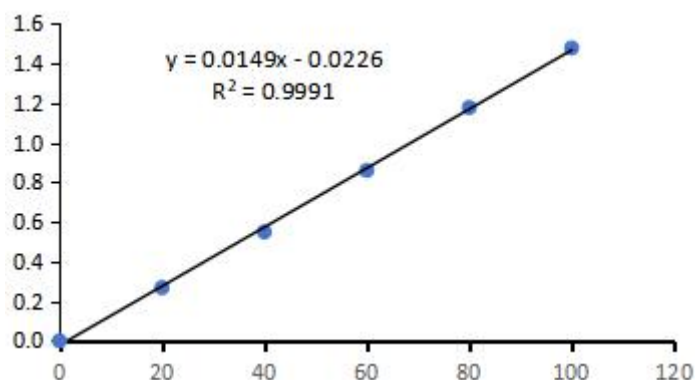
【注】：1.若 ΔA 较小，可延长 37°C 的孵育时间 T (如增至 4 小时或更长)，或增加土样质量 W (如增至 0.3g)。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

2.若测定管 A 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1.5，可缩短 37°C 的孵育时间 T (如减至 0.5 小时或更短)，或减少土样质量 W (如减至 0.05g)。则改变后 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

或对最后一步的待检测上清液 (包括测定管、对照管和空白管) 同时用蒸馏水进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0149x - 0.0226$ ；x 为标准品摩尔质量 (nmol)，y 为 ΔA 。



2、单位定义：每小时每克土样中产生 1nmol 对-硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{S-CBH 活力}(\text{nmol/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0226) \div 0.0149 \div W \div T \times D \\ &= 33.6 \times (\Delta A + 0.0226) \div W \times D \end{aligned}$$

T---反应时间，2h；

W---土壤样本实际取样量，g；

PNP 相对分子质量---139.11；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

1 向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解，标准品母液浓度为 10 $\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200 μL ，加入 800 μL 蒸馏水，混匀得到 2 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 μL	0	40	80	120	160	200
水 μL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
------------------------	-----	--------------

标品	50	
蒸馏水		50
试剂一	750	750
试剂三	200	200
混匀,取 700μL 上清液至 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中,405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		