

土壤碱性半纤维素酶/土壤碱性木聚糖酶试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TR074 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。

土壤碱性木聚糖酶在碱性环境中水解木聚糖降解成还原性寡糖和单糖, 在沸水浴条件下进一步与 3,5-二硝基水杨中发生显色反应, 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℃保存	
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 10mL×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:

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 (恒温振荡仪)、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℃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:

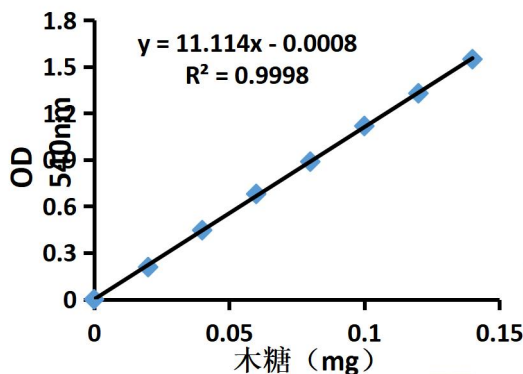
上清液	40	40
试剂三	200	200
混匀, 沸水浴 (95-100℃, 可用封口膜缠紧, 防止水分流失) 5min 后, 冷却至室温,		
蒸馏水	800	800
混匀, 取 800μL 液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

【注】: 1. 若 ΔA 较小, 可延长 40℃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: 碱性条件下, 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。

$$\begin{aligned} \text{土壤碱性木聚糖酶活力}(\text{mg/d/g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0008) \div 11.114] \times (V2 \div V1) \div W \div T \times D \\ &= 8.1 \times (\Delta A + 0.0008) \div W \times D \end{aligned}$$

V1---显色反应中上清液体积, $40\mu\text{L}=0.04\text{mL}$; V2---反应总体积, $900\mu\text{L}=0.9\text{mL}$;

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°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。