

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-W-TR074 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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 酶标仪预热 30min, 调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (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。		

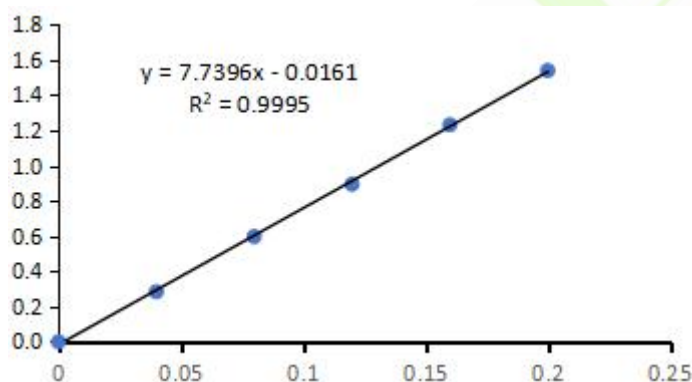
蒸馏水	800	800
混匀，若浑浊则 8000rpm 室温离心 5min，取 200μL 液体至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

【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 或更多，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： $y = 7.7396x - 0.0161$ ，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。

$$\text{土壤碱性木聚糖酶活力}(\text{mg/d/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0161) \div 7.7396] \times (V2 \div V1) \div W \div T \times D$$

$$= 11.6 \times (\Delta A + 0.0161) \div W \times D$$

V1---显色反应中上清液体积，40μL=0.04mL；

V2---反应总体积，900μL=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 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存），标准品母液浓度为 5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 1, 2, 3, 4, 5. mg/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 600uL，加入 400uL 蒸馏水，混匀得到 3mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	1	2	3	4	5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，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	40	
蒸馏水		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 200μL 液体至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		