

土壤外切-β-1,4-葡聚糖酶（S-CBH）活性测定试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 90mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×2 支	4℃保存	临用前每支加入 1.5mL 蒸馏水溶解，4 度保存。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃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、土壤外切-β-1,4-葡聚糖酶活性测定：

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 以上，调节波长至 405nm，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	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）。			

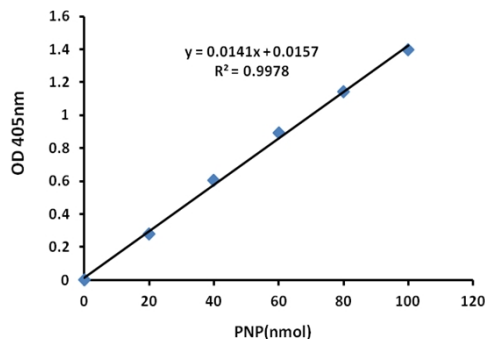
【注】：1.若 ΔA 较小，可延长 37℃的孵育时间 T（如增至 4 小时或更长），或增加土样质量 W（如增至 0.3g）。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

2.若测定管 A 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1.5，可缩短 37℃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： $y = 0.0141x + 0.0157$ ；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。

$$\begin{aligned} \text{S-CBH 活力}(\text{nmol/h/g 土样}) &= (\Delta A - 0.0157) \div 0.0141 \div W \div T \times D \\ &= 35.5 \times (\Delta A - 0.0157) \div W \times D \end{aligned}$$

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 制备标准品母液（10 $\mu\text{mol/mL}$ ）：向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入：50 μL 标准品+750 μL 试剂一+200 μL 试剂三，混匀，取 200 μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值，根据结果制作标准曲线。