

土壤外切-β-1, 4-葡聚糖酶/纤维二糖水解酶 (S-C1) 活性测定

试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

C1 (EC3.2.1.91) 存在于细菌、真菌和动物体内, 是纤维素酶系的组份之一, C1 催化多聚糖链的末端非还原端释放出纤维二糖和葡萄糖。

测定原理:

采用 3,5-二硝基水杨酸法测定 S-C1 催化微晶纤维素降解产生的还原糖的含量。

需自备的仪器和用品:

酶标仪/可见分光光度计、水浴锅、离心机、可调式移液器、96 孔板/微量石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 液体 6mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 液体 25mL×1 瓶, 4°C 保存;

样品测定的准备:

称取约 0.1g 新鲜土样或风干土样, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 室温振荡提取 30min, 然后 10000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
- 2、加样表 (在 EP 管中依次加入下列试剂):

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	100	
蒸馏水		100
混匀, 37°C 准确水浴 2h		
试剂二	200	200

混匀, 90°C 水浴 10min (盖紧, 防止水分散失), 冷却后, 取 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 测 540nm 下吸光值 A, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

S-C1 活性计算

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件下测定回归方程为 $y = 6.4078x - 0.0673$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

单位的定义: 每 g 土样每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-C1 活力} (\mu\text{g} / \text{min} / \text{g 鲜重}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \div W \end{aligned}$$

1000: 1mg/mL=1000ug/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.11mL; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 120 min; W: 样本质量, g;

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定回归方程为 $y = 3.2039x - 0.0673$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。
单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 $1 \mu\text{g}$ 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-C1 活力}(\mu\text{g} / \text{min} / \text{g 鲜重}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 28.61 \times (\Delta A + 0.0673) \div W \end{aligned}$$

1000: $1\text{mg/mL} = 1000\mu\text{g/mL}$; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.11mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 120 min; W : 样本质量, g。