

土壤外切-β-1, 4-葡聚糖酶/纤维二糖苷酶 (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℃保存；

试剂一：液体6mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体25mL×1瓶，4℃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℃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℃准确水浴2h

试剂二	200	200
-----	-----	-----

混匀，90℃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 $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

1000: 1mg/mL=1000ug/mL;  $V_{\text{反总}}$ : 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;

**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 $\mu$ 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: 1mg/mL=1000ug/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。