

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

分光光度法 50 管/24 样

注意：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 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：

可见分光光度计、水浴锅、离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 60mL×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	50	50
试剂一	500	
蒸馏水		500

混匀，37℃ 准确水浴 2h

试剂二	1000	1000
-----	------	------

混匀，90℃ 水浴 10min（盖紧，防止水分散失），冷却后，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：

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 $1 \mu\text{g}$ 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

1000: $1\text{mg/mL} = 1000\mu\text{g/mL}$; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.55mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 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。