

土壤外切- β -1, 4-葡聚糖酶/纤维二糖苷酶 (S-C1)

检测试剂盒 (微量法)

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

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：

- 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 (μ L)	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 200 μ L 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 μ 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 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 μ 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 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。

3. 加入试剂四后必须立即混匀, 否则显色不完全。