

土壤几丁质酶试剂盒说明书

(分光法 24 样)

一、产品简介：

多种微生物、动物、植物等都可产生几丁质酶，土壤中几丁质酶主要水解几丁质多聚体产生 N-乙酰氨基葡萄糖，该产物进一步与铁氰化钾反应，于 420nm 处检测，进而计算得到土壤几丁质酶活性大小。

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 18mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 1.5mL 盐酸充分混匀溶解后，再加 1.7mL 蒸馏水混匀备用。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 19mL×1 支	4℃保存	
试剂五	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	粉体 g×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 30mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、天平、水浴锅、低温离心机、盐酸、蒸馏水。

四、土壤几丁质酶活性测定：

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 37℃烘箱风干，先粗研磨，过 40 目筛网备用。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 420nm，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
土样 (g)	0.1g	0.1g
试剂一	300	400
试剂二	100	
混匀，37℃（恒温培养箱）孵育 3h，4000rpm 离心 5min，取上清。		

③ 在 EP 管中依次加入：

上清液	200	200
试剂三	10	10
试剂四	370	370
混匀，37℃孵育 1h。		
试剂五	120	120

混匀，4000rpm 离心 5min，取上清液待测。

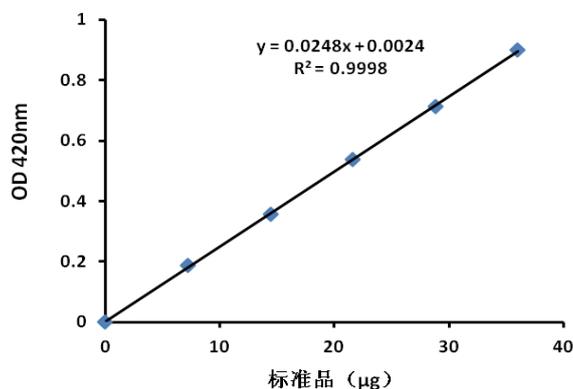
④ 在 EP 管中依次加入：

上清液	360	360
试剂六	480	480
混匀，95-100℃煮沸 10min，若有沉淀，于 12000rpm 室温离心 5min，取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿中于 420nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】若 ΔA 较小，可以加大样本量（如增至 0.2g），或延长 37℃ 的孵育时间（由 3h 增加至 5h 或更长），则改变后的样本重量 W 和反应时间 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0248x + 0.0024$ ，X 是标准品质量（ μg ），y 是 ΔA 。



2、按照样本重量计算：

酶活定义：每克土壤每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{g}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤几丁质酶活性}(\mu\text{g/h/g 土壤}) &= [(\Delta A - 0.0024) \div 0.0248 \times 3.89] \div W \div T \\ &= 52.3 \times (\Delta A - 0.0024) \div W \end{aligned}$$

T---反应时间，3h；

W---样本质量，g；

3.89---体积系数；

标准品分子量---221.21；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（ 1mg/mL ）：标准品临用前加 2mL 蒸馏水，即为 1mg/mL 。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/mL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据第④步骤的加样体系： $360\mu\text{L}$ 标准品+ $480\mu\text{L}$ 试剂六，混匀，95-100℃煮沸 10min，取全部液体至 1mL 玻璃比色皿中于 420nm 处读取各管吸光值 A，标准品的质量作为横坐标，0 mg/mL 对应的 A 值减去各浓度标准品对应的 A 之差作为纵坐标，即可得出标准曲线。