

## 土壤 $\beta$ -葡萄糖苷酶 (Solid- $\beta$ -Glucosidase, S- $\beta$ -GC) 试剂盒说明书

### (分光法 24 样)

#### 一、产品简介:

土壤 $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -GC, EC 3.2.1.21) 能够催化水解芳基或烃基与糖基原子团之间的糖苷键生成葡萄糖, 是纤维素分解酶系中重要组成成分之一, 在土壤微生物的糖类代谢方面具有重要生理功能。

土壤 $\beta$ -葡萄糖苷酶能够催化对-硝基苯- $\beta$ -D 吡喃葡萄糖苷生成黄色物质对-硝基苯酚 (PNP), 该物质在 405nm 有特征光吸收, 进而得到土壤 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性。

#### 二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg $\times$ 1 瓶	-20 $^{\circ}$ C 保存	临用前加入 4.5mL 蒸馏水, 充分溶解备用, 用不完的试剂仍-20 $^{\circ}$ C 保存;
试剂二	液体 20mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}$ C 保存	
试剂三	液体 20mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}$ C 保存	
标准品	粉剂 $\times$ 1 支	4 $^{\circ}$ C 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)、台式离心机、恒温振荡培养箱/水浴锅、可调式移液器、天平。

#### 四、土壤 $\beta$ -葡萄糖苷酶 (S- $\beta$ -GC) 酶活检测:

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、样本处理:

取新鲜土样或干土 (风干或者 37 度烘箱风干), 先粗研磨, 过 40 目筛网备用。

**【注】:** 土壤风干, 减少土壤中水分对于实验的干扰; 土壤过筛, 保证取样的均匀细腻;

##### 2、测定步骤:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
土样 (g)	0.05	0.05	
试剂一	150		150
蒸馏水		150	
试剂二	300	300	300
混匀, 37 $^{\circ}$ C 振荡反应 1h			
试剂三	350	350	350
混匀, 12000rpm 室温离心 10min, 取全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ (每个样本做一个自身对照)。			

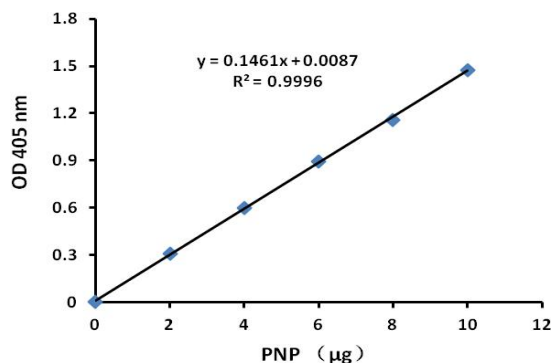
**【注】:** 1. 若  $\Delta A$  在零附近徘徊, 可延长 37 $^{\circ}$ C 的孵育时间 T (如增至 4 小时或更长), 或增加土样质量 W (如增至 0.2g)。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

2. 若测定管 A 值大于 1.5 或  $\Delta A$  大于 1.5, 可缩短 37 $^{\circ}$ C 的孵育时间 T (如减至 0.5 小时或更短)。

则改变后 T 需代入计算公式重新计算。或对最后一步的待检测上清液 (包括测定管、对照管和空白管) 同时用蒸馏水进行稀释, 稀释倍数 D 代入计算公式。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程为  $y = 0.1461x + 0.0087$ ；x 为标准品质量 ( $\mu\text{g}$ )，y 为  $\Delta A$ 。



2、单位定义：每小时每克土样中产生 1nmol 对-硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{S-}\beta\text{-GC 活力}(\text{nmol/h/g 土样}) &= (\Delta A - 0.0087) \div 0.1461 \div \text{Mr} \times 10^3 \div \text{W} \div \text{T} \times \text{D} \\ &= 49.2 \times (\Delta A - 0.0087) \div \text{W} \times \text{D} \end{aligned}$$

T---反应时间，1h；

W---实际称取土样质量，g；

Mr--- PNP 相对分子质量，139.11；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL)：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管依次加入：20 $\mu\text{L}$  标准品+130 $\mu\text{L}$  蒸馏水+300 $\mu\text{L}$  试剂二+350 $\mu\text{L}$  试剂三，混匀，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。