

# 土壤 $\beta$ -木糖苷酶 (Solid- $\beta$ - xylosidase) 测定试剂盒说明书

(微板法 48 样)

## 一、产品简介：

$\beta$ -木糖苷酶(EC3.2.1.37)是一类重要的木聚糖降解水解酶，存在于细菌和真菌等生物体，主要从非还原末端把木二糖和低聚木糖催化切割为木糖单体，产物木糖可作为碳源应用于微生物发酵。

土壤中 $\beta$ -木糖苷酶催化对硝基苯酚- $\beta$ -D-木糖苷产生对硝基苯酚(PNP)，该产物在 405nm 处有特征吸收峰，通过测定 405nm 光吸收增加速率，即可计算土壤 $\beta$ -木糖苷酶活性。

## 二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg $\times$ 1 支	4 $^{\circ}$ C 保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 1.4mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 6mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}$ C 保存	
试剂三	液 22mL $\times$ 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：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、低温离心机、蒸馏水。

## 四、土壤 $\beta$ -木糖苷酶活性测定：

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、样本的制备：

取新鲜土样风干或者 37 $^{\circ}$ C 烘箱风干，先粗研磨，过 40 目筛网，再次研磨过 60 目筛网，备用。

**【注】：**土壤风干，减少土壤中水分对于实验的干扰；土壤过粗细两次筛，保证取样的均匀细腻；

### 2、上机检测：

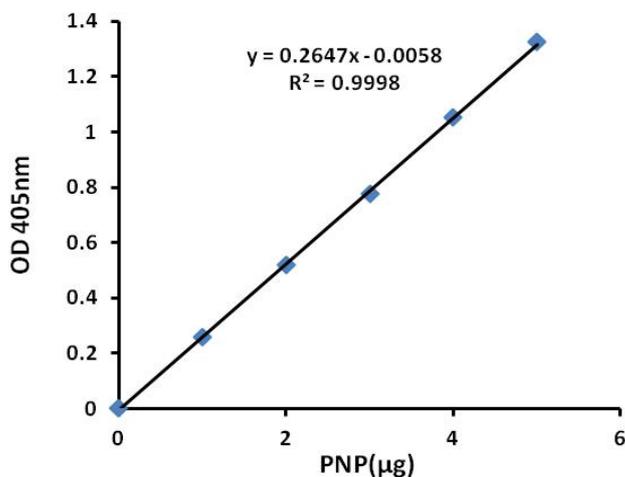
- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm。
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称	测定管	对照管
风干土样 (g)	0.05	0.05
试剂一 ( $\mu$ L)	25	
蒸馏水		25
试剂二 ( $\mu$ L)	55	55
混匀，45 $^{\circ}$ C 振荡反应 30min		
试剂三 ( $\mu$ L)	220	220
混匀，12000rpm，离心 10min，取上清液 200 $\mu$ L 于 96 孔板中，405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需做一个自身对照)。		

- 【注】：**
1. 若  $\Delta A$  过小，可以增加土样量或延长保温时间 (如：40min 或更长)，重新调整的样本量 W 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。
  2. 若 A 测定超过 1.5，可以减少土样量或降低保温时间 (如：10min)，重新调整的样本量 W 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y=0.2647x-0.0058$ ；x 为标准品质量（ $\mu\text{g}$ ），y 为吸光值  $\Delta A$ 。



2、单位定义：每小时每克土样中产生  $1\mu\text{g}$  对-硝基苯酚（PNP）定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤 } \beta\text{-木糖苷酶活性 } (\mu\text{g/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0058) \div 0.2647 \div W \div T \\ &= 7.56 \times (\Delta A + 0.0058) \div W \end{aligned}$$

T----反应时间，30min=0.5h；

W----实际称取干土质量；

PNP 相对分子质量---139.11。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（ $1\text{mg/mL}$ ）：向标准品 EP 管里面加入  $1\text{ml}$  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 $\text{mg/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入： $20\mu\text{L}$  标准品+ $5\mu\text{L}$  蒸馏水+ $55\mu\text{L}$  试剂二+ $220\mu\text{L}$  试剂三，混匀，取  $200\mu\text{L}$  至 96 孔板中，于  $405\text{nm}$  下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。