

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

（货号：BP10096F 分光法 24 样 有效期：6 个月）

### 一、指标介绍：

$\alpha$ -木糖苷酶(EC 3.2.1.177)是一类木聚糖降解水解酶，存在于微生物等生物体，促使非还原末端 $\alpha$ -D-木糖残基的水解，释放出 $\alpha$ -D-木糖。

土壤中 $\alpha$ -木糖苷酶催化对硝基苯酚- $\alpha$ -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 $\alpha$ -木糖苷酶活性。

### 二、试剂盒组成和配制：

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度     | 注意事项                                                                         |
|------|-------------|----------|------------------------------------------------------------------------------|
| 试剂一  | 粉剂 2 瓶      | -20℃避光保存 | 每瓶：<br>1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 2.5mL 蒸馏水溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂二  | 液体 20mL×1 瓶 | 4℃保存     |                                                                              |
| 试剂三  | 液体 20mL×1 瓶 | 4℃保存     |                                                                              |
| 标准品  | 粉剂 1 支      | 4℃避光保存   | 1. 若重新做标曲，则用到该试剂；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>3. 溶解后的标品一周内用完。                 |

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本的制备：

取新鲜土样风干或者 37℃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、检测步骤：

① 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：

| 试剂组分          | 测定管 | 对照管 |
|---------------|-----|-----|
| 风干土样（g）       | 0.1 | 0.1 |
| 试剂一（ $\mu$ L） | 150 |     |
| 蒸馏水           |     | 150 |
| 试剂二（ $\mu$ L） | 300 | 300 |
| 混匀，40℃振荡反应 2h |     |     |
| 试剂三（ $\mu$ L） | 350 | 350 |

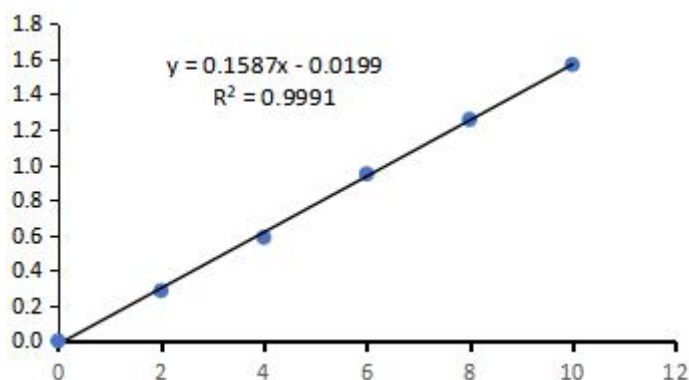
混匀，12000rpm，离心 10min，取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个自身对照）。

【注】：1.若 $\Delta A$  过小，可以增加土样量 W 或延长保温时间（如：24h 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 W 或降低保温时间 T（如：30min），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： $y = 0.1587x - 0.0199$ ；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 1nmol 对-硝基苯酚（PNP）定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤}\alpha\text{-木糖苷酶}(\text{nmol/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0199) \div 0.1587 \div \text{Mr} \times 10^3 \div W \div T \times D \\ &= 22.6 \times (\Delta A + 0.0199) \div W \times D \end{aligned}$$

T---反应时间，2h；

W---实际称取干土质量，g；

PNP 相对分子质量---139.11。

附：标准曲线制作过程：

1 向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水，标准品母液浓度为 5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

|                                                    |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 0.5mg/mL 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>mg/mL                                      | 0   | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 标品稀释液<br>uL                                        | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL                                               | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                          |     |     |     |     |     |     |

3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

|                       |     |             |
|-----------------------|-----|-------------|
| 试剂名称（ $\mu\text{L}$ ） | 标准管 | 0 浓度管（仅做一次） |
| 标品                    | 20  |             |

|                                                                        |     |     |
|------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 蒸馏水                                                                    | 130 | 150 |
| 试剂二                                                                    | 300 | 300 |
| 试剂三                                                                    | 350 | 350 |
| 混匀，取全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。 |     |     |