

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

（分光法 24 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 1.8mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 15mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}$ C 保存	
试剂三	液体 33mL $\times$ 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）、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 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：

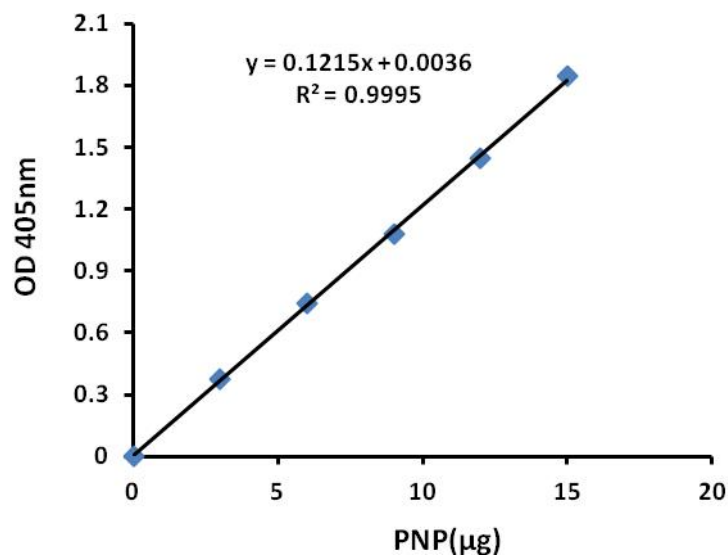
试剂名称	测定管	对照管
风干土样 (g)	0.1	0.1
试剂一 ( $\mu$ L)	75	
蒸馏水		75
试剂二 ( $\mu$ L)	165	165
混匀， 45 $^{\circ}$ C 振荡反应 30min		
试剂三 ( $\mu$ L)	660	660
混匀，12000rpm，离心 10min，取全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ （每个样本需做一个自身对照）。		

**【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： $y=0.1215x+0.0036$ ；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。

$$\begin{aligned} \text{土壤 } \beta\text{-木糖苷酶活性 } (\mu\text{g/h/g 土样}) &= (\Delta A - 0.0036) \div 0.1215 \div W \div T \\ &= 16.5 \times (\Delta A - 0.0036) \div W \end{aligned}$$

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： $60\mu\text{L}$  标准品+ $15\mu\text{L}$  蒸馏水+ $165\mu\text{L}$  试剂二+ $660\mu\text{L}$  试剂三，混匀，取全部上清液转移至  $1\text{mL}$  玻璃比色皿中，于  $405\text{nm}$  下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。