

土壤β-木糖苷酶 (Solid-β- xylosidase, S-β-XYS) 测定试剂盒说明书

微量法 100T/48S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

β-木糖苷酶(EC3.2.1.37)存在于植物、细菌和真菌等生物体，是催化木聚糖类半纤维素降解的关键酶，产物木糖可作为碳源应用于微生物发酵。另外，β-木糖苷酶还可以作为生物漂白剂应用于造纸工业，比传统的漂白法环保，具有广泛的应用价值。

测定原理：

S-β-XYS 催化对硝基苯酚-β-D-木糖苷产生对硝基苯酚，对硝基苯酚在 405nm 处有特征吸收峰，测定 405nm 光吸收增加速率，可计算 S-β-XYS 活性。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 1mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

粗酶液提取：

约 0.1g 鲜土或风干土样，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆，室温振荡提取 30min，然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清待测。

测定操作表：

1、分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 405nm。

2、操作表

	对照管	测定管
样本 (μL)	40	40
试剂一 (μL)		10
试剂二 (μL)	80	70
混匀，45℃水浴 20min		
试剂三 (μL)	80	80
混匀，静置 5min，405nm 处测定吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个对照管。		

β-木糖苷酶活性计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 13.226x + 0.0011$ ， $R^2 = 0.9998$ ；x 为标准品浓度 (μmol/mL)，y 为吸光值 ΔA。

酶活定义：每克土样每天催化产生 1μmol 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 } (\mu\text{mol/d/g 土样}) = (\Delta A - 0.0011) \div 13.226 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 16.33 \times (\Delta A - 0.0011) \div W$$

V 样总：加入提取液体积，1mL； V 反总：反应总体积，0.12mL； V 样：反应中样品体积，0.04mL； W：样品质量，g； T：反应时间，20min=1/72d；

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y=6.613x+0.0011$, $R^2=0.9998$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光值 ΔA
酶活定义: 每克土样每天催化产生 $1\mu\text{mol}$ 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

β -木糖苷酶活性 ($\mu\text{mol/d/g}$ 土样) $=(\Delta A-0.0011) \div 6.613 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$
 $=32.66 \times (\Delta A-0.0011) \div W$

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL ; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.12mL ; $V_{\text{样}}$: 反应中样品体积,
 0.04mL ; W : 样品质量, g ; T : 反应时间, $20\text{min}=1/72\text{d}$;

ΔA 控制在 $0.01-1$ 范围内, 若 ΔA 大于 1 , 可适当减小样本量。

标准曲线线性范围为: $0.01\mu\text{mol/mL}-0.5\mu\text{mol/mL}$ 。