

## 土壤 $\beta$ -木糖苷酶 (Solid- $\beta$ -xylosidase, S- $\beta$ -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：

$\beta$ -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， $\beta$ -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- $\beta$ -XYS 催化对硝基苯酚- $\beta$ -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- $\beta$ -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 ( $\mu$ L)	40	40
试剂一 ( $\mu$ L)		10
试剂二 ( $\mu$ L)	80	70
混匀，45℃水浴 20min		
试剂三 ( $\mu$ L)	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。		

### $\beta$ -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 ( $\mu\text{mol/mL}$ ),  $y$  为吸光值  $\Delta A$ 。

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。

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

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

**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  $\Delta A$

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。

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

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

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

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