

## 土壤 $\alpha$ -木糖苷酶试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TR045 微板法 48 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 mg $\times$ 3 瓶	-20 $^{\circ}$ C 避光保存	每瓶: 1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 3mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 35mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}$ C 保存	
试剂三	液 40mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}$ C 保存	
标准品	粉剂 $\times$ 1 支	4 $^{\circ}$ C 避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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 $^{\circ}$ C 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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。
- ② 在 EP 管中依次加入:

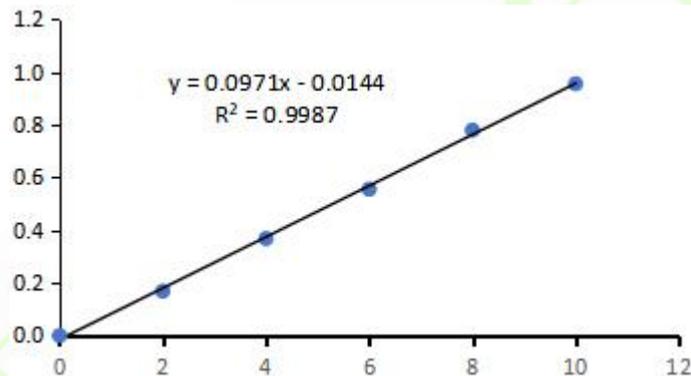
试剂组分	测定管	对照管
风干土样 (g)	0.1	0.1

试剂一 (μL)	150	
蒸馏水		150
试剂二 (μL)	300	300
混匀, 40°C振荡反应 2h		
试剂三 (μL)	350	350
混匀, 12000rpm, 离心 10min, 取上清液 200μL 于 96 孔板中, 405nm 下读取吸光值 A, ΔA= A 测定- A 对照 (每个样本需做一个自身对照)。		

- 【注】：1.若ΔA 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:  $y = 0.0971x - 0.0144$ ; x 为标准品质量 (μg), y 为吸光值 ΔA。



- 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。

$$\text{土壤}\alpha\text{-木糖苷酶}(\text{nmol/h/g 土样}) = (\Delta A + 0.0144) \div 0.0971 \div \text{Mr} \times 10^3 \div W \div T \times D$$

$$= 37.02 \times (\Delta A + 0.0144) \div W \times D$$

T---反应时间, 2h;                      W---实际称取土壤质量, g;  
 PNP 相对分子质量---139.11;        D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (5mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1ml 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, 0.5mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入: 20μL 标准品+130μL 蒸馏水+300μL 试剂二+350μL 试剂三, 混匀, 取 200μL 至 96 孔板中, 于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。

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 mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 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 (μL)	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 200μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		