土壤α-木糖苷酶（Solid-β- xylosidase）测定试剂盒说明书

（货号：ADS-F-TR045　分光法 24 样　有效期：6 个月）

一、指标介绍：

α-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α-D-木糖残基的水解，释放出α-D-木糖。

土壤中α-木糖苷酶催化对硝基苯酚-α-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α-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： 1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.5mL 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 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； 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）、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（μL）	150	
蒸馏水		150
试剂二（μL）	300	300
混匀，　40℃振荡反应 2h		
试剂三（μL）	350	350

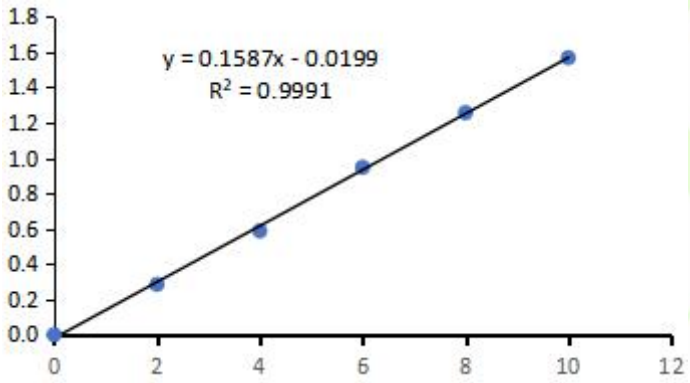
混匀，12000rpm，离心 10min，取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 下读取吸光值 A，△A= A 测定- A 对照（每个样本需做一个自身对照）。

【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、标准曲线方程：y = 0.1587x - 0.0199；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。

土壤α-木糖苷酶(nmol/h/g 土样) =(ΔA+0.0199)÷0.1587÷Mr×10^3÷W÷T×D

=22.6×(ΔA+0.0199)÷W×D

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 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，△A=A 测定-0 浓度管。		