

## 土壤酸性木聚糖酶（Soil Acidic Xylanase, S-ACX）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：

木聚糖酶(EC 3.2.1.8)主要由微生物产生，能催化水解木聚糖，也被称为戊聚糖酶或半纤维素酶，可分解酿造或饲料工业中的原料细胞壁以及  $\beta$ -葡聚糖，降低酿造中物料的粘度，促进有效物质的释放，以及降低饲料中的非淀粉多糖，促进营养物质的吸收利用，因而广泛的应用于酿造和饲料工业中，ACX 一般分离自耐酸的真菌，细菌及部分霉菌。

#### 测定原理：

ACX 在酸性环境下能将木聚糖降解成还原性寡糖和单糖，进一步在沸水浴条件下与 3,5-二硝基水杨酸发生显色反应，在 540nm 处有特征吸收峰，反应液颜色的深浅与酶解产生的还原糖量成正比，通过测定反应液在 540nm 吸光值增加速率，可计算 ACX 活力。

#### 自备实验用品及仪器：

天平、常温离心机、震荡仪、恒温水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板。

#### 试剂组成和配制：

缓冲液：液体 10mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 3mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃避光保存。

#### 样品处理

新鲜土样风干，过 30-50 目筛。

#### 测定操作表：

1、 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 540nm。

2、 操作表

	对照管	测定管
土样 (g)	0.02	0.02
缓冲液 ( $\mu$ L)	150	100
试剂一 ( $\mu$ L)		50
混匀，50℃震荡反应 30min，立即 90℃水浴 10min，8000g，25℃离心 10min，取上清 100 $\mu$ L		
试剂二 ( $\mu$ L)	100	100
混匀，90℃水浴中显色 5min，取 180 $\mu$ L 于微量石英比色皿/96 孔板测定 540nm 处吸光值 A，分别记为 A 对照管、A 测定管， $\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管。		

**S-ACX 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：  $y = 2.5554x - 0.002$  ，  $R^2 = 0.9983$

酶活定义： 50°C， pH4.8 条件下， 每克土壤每天分解木聚糖产生 1 $\mu$ mol 还原糖所需的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{S-ACX 活力 } (\mu\text{mol/d/g 土样}) &= (\Delta A + 0.002) \div 2.5554 \times V \text{ 反总} \times 10^3 \div W \div T \div 150 \\ &= 18.78 \times (\Delta A + 0.002) \div W \end{aligned}$$

V 反总： 反应总体积， 0.15mL； T： 反应时间， 1/48d； 1000： 1mmol/L = 10<sup>3</sup> $\mu$ mol/L； 150： 木糖分子量。

**b.用 96 孔板测定的计算公式如下**

标准曲线：  $y = 1.2777x - 0.002$  ，  $R^2 = 0.9983$

酶活定义： 50°C， pH4.8 条件下， 每克土壤每天分解木聚糖产生 1 $\mu$ mol 还原糖所需的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{S-ACX 活力 } (\mu\text{mol/d/g 土样}) &= (\Delta A + 0.002) \div 1.2777 \times V \text{ 反总} \times 10^3 \div W \div T \div 150 \\ &= 37.56 \times (\Delta A + 0.002) \div W \end{aligned}$$

V 反总： 反应总体积， 0.15mL； T： 反应时间， 1/48d； 1000： 1mmol/L = 10<sup>3</sup> $\mu$ mol/L； 150： 木糖分子量。

**注意事项：**

1. 保证震荡反应 30min， 使酶与底物充分接触。
2. 注意 90°C 水浴防止爆开， 以免改变反应体系。