

土壤酸性木聚糖酶（S-ACX）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC5725

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
缓冲液	液体 35 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 18 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

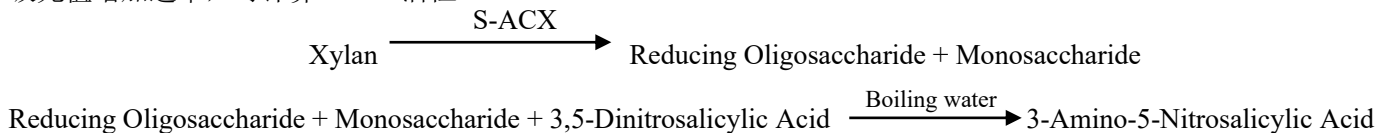
溶液的配制：

- 1、标准品稀释液的配制：临用前按缓冲液：试剂一= 4mL：2mL（6mL，约一条标曲稀释用量）的比例进行配制，现配现用。
- 2、标准品：10mg 木糖。临用前加入 667μL 标准品稀释液配制成 100μmol/mL 的木糖标准液，2-8℃保存 8 周。

产品说明：

土壤酸性木聚糖酶（Soil acid xylanase, S-ACX），又称为土壤酸性半纤维素酶，主要分离自最适生长pH为4-5的微生物。

在酸性环境中，S-ACX催化木聚糖降解成还原性寡糖和单糖，在沸水浴条件下进一步与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S-ACX活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、天平、低温离心机、水浴锅、研钵、30~50目筛、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

新鲜土样自然风干或 37℃烘箱风干，过 30~50 目筛。

二、测定步骤

1、可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至540nm，分光光度计用蒸馏水调零。

2、标准品的稀释：临用前将标准品用**标准品稀释液**稀释为2、1.5、1.2、1、0.8、0.4、0.2μmol/mL的标准品待测。

3、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度 (μmol/mL)	标准品体积 (μL)	稀释液体积 (μL)	稀释后浓度 (μmol/mL)
1	100	100	900	10
2	10	200	800	2
3	10	150	850	1.5
4	10	120	880	1.2
5	10	100	900	1
6	1	200	50	0.8
7	1	100	150	0.4
8	1	50	200	0.2

备注：实验中每管需要150μL。

4、样本测定（在EP管中加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	空白管	标准管
样本	0.05g	0.05g	-	-
缓冲液	200	200	-	-
试剂一	-	100	-	-
涡旋混匀，置于50°C水浴锅中反应2h，立即沸水浴中10min灭活。 (注意不要让盖子爆开，以免进水，改变了反应体系)，冷却至室温。			-	-
试剂一	100	-	-	-
常温，12000g离心10min，取上清			-	-
上清液	150	150	-	-
标准品	-	-	-	150
标准品稀释液	-	-	150	-
试剂二	100	100	100	100
涡旋混匀，沸水浴中准确显色 5min(注意不要让盖子爆开，以免进水改变了反应体系)，冷却至室温后，室温 12000g 离心 5min，吸取上清液 200μL 于 96 孔板或微量玻璃比色皿中，测定各管 540nm 下的吸光度，分别记为 A 对照、A 测定、A 空白、A 标准。计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。空白管和标准曲线只需测 1-2 次。每个测定管需设一个对照管。				

三、S-ACX 计算公式

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度 (x, μmol/mL) 和吸光度 $\Delta A_{标准}$ (y, $\Delta A_{标准}$)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{测定}$ (y, $\Delta A_{测定}$) 带入公式计算样本浓度 (x, μmol/mL)。

2. 土壤S-ACX活性计算：

酶活定义：50°C，pH 4.8条件下，每克土壤每小时分解木聚糖产生1μmol还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活性单位。

$$S-ACX \text{ 活性 (U/g 土样)} = x \times V_{反总} \div W \div T \times F = 0.15 \times x \div W \times F$$

V反总：反应体系总体积，0.3mL；W：样本质量，g；T：反应时间，2h；F：稀释倍数。

注意事项：

1. 若样本 $\Delta A < 0.01$ ，可适当增大样本量或者 50°C 反应时间后测定；若样本 $\Delta A > 1.5$ 或者 $A_{\text{测定}} > 1.5$ 时，可用蒸馏水稀释上清液后测定，注意同步修改计算公式中的稀释倍数。
2. 建议使用螺旋管，防止沸水浴过程中盖子爆开，改变反应体系。

实验实例：

- 1、取 0.05g 野蘑菇土样，按操作表进行第一步反应 2h 后，取上清液用蒸馏水稀释 2 倍后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.431 - 0.099 = 0.332$ ，带入标曲 $y = 0.6582x - 0.153$ ($R^2 = 0.999$)，计算 $x = 0.737$ ，按样本质量计算 S-ACX 活性得：

$$\text{S-ACX 活性 (U/g 土样)} = 0.15 \times x \div W \times F = 4.422 \text{ U/g 土样。}$$

相关系列产品：

BC5730/BC5735 土壤中性木聚糖酶 (S-NEX) 活性检测试剂盒

BC5740/BC5745 土壤碱性木聚糖酶 (S-BAX) 活性检测试剂盒

