

土壤酸性木聚糖酶 (S-ACX) 检测试剂盒 (微量法)

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 β -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。

试剂组成和配制：

缓冲液：液体 10mL \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂一：液体 3mL \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 避光保存。

试剂二：液体 10mL \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 避光保存。

样品处理：

新鲜土样风干，过 30-50 目筛。

测定步骤表：

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 (μ L)	150	100
试剂一 (μ L)		50
混匀，50 $^{\circ}$ C 震荡反应 30min，立即 90 $^{\circ}$ C 水浴 10min，8000g，25 $^{\circ}$ C 离心 10min， 取上清 100 μ L		
试剂二 (μ L)	100	100
混匀，90 $^{\circ}$ C 水浴中显色 5min，取 180 μ 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 μ 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 = 10³ μ 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 μ 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 = 10³ μ 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。