

β-木糖苷酶 (β-xylosidase) 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：

β-木糖苷酶(EC3.2.1.37)存在于植物、细菌和真菌等生物体，是催化木聚糖类半纤维素降解的关键酶，产物木糖可作为碳源应用于微生物发酵。另外，β-木糖苷酶还可以作为生物漂白剂应用于造纸工业，比传统的漂白法环保，具有广泛的应用价值。

测定原理：

β-木糖苷酶催化对硝基苯酚-β-D-木糖苷产生对硝基苯酚，对硝基苯酚在405nm处有特征吸收峰，测定405nm光吸收增加速率，可计算β-木糖苷酶活性。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体1mL×1瓶，4°C避光保存。

试剂二：液体10mL×1瓶，4°C保存。

试剂三：液体10mL×1瓶，4°C保存。

粗酶液提取：

组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆，然后10000g，4°C，离心20min，取上清待测。

细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后10000g，4°C，离心10min，取上清置于冰上待测。

液体：直接检测。

测定操作表：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至405nm。
2. 操作表

	对照管	测定管
酶液（μL）	40	40
试剂一（μL）		10
试剂二（μL）	80	70
混匀，45°C水浴20min		

试剂三 (μL)	80	80
混匀，静置5min，405nm处测定吸光值A，计算ΔA=A测定管-A对照管。每个测定管设一个对照管。		

β-木糖苷酶活性计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线：y=13.226x+0.0011，R2=0.9998；x为标准品浓度（μmol/mL），y为吸光值ΔA。

1、按蛋白浓度计算

酶活定义：45°C，pH7.4时每毫克蛋白1min内催化产生1 nmol对硝基苯酚为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/ mg prot)} &= (\Delta A - 0.0011) \div 13.226 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 11.34 \times (\Delta A - 0.0011) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2、按样本质量计算：

酶活定义：45°C，pH7.4时每克样品1min内催化产生1 nmol对硝基苯酚为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A - 0.0011) \div 13.226 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times 1000 = 11.34 \times (\Delta A - 0.0011) \div W$$

3. 按细胞数量计算：

酶活定义：45°C，pH7.4时每104个细胞1min内催化产生1 nmol对硝基苯酚为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/104cell)} = (\Delta A - 0.0011) \div 13.226 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量 (万个)} \div T \times 1000 = 11.34 \times (\Delta A - 0.0011) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义：45°C，pH7.4时每毫升液体1min内催化产生1 nmol对硝基苯酚为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/ mL)} &= (\Delta A - 0.0011) \div 13.226 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 \\ &= 11.34 \times (\Delta A - 0.0011) \end{aligned}$$

V样总：加入提取液体积，1mL； V反总：反应总体积，0.12mL； V样：反应中样品体积，0.04mL； Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL； W：样品质量，g； T：反应时间，20min； 1000:1μmol/L=1000nmol/L

b.用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线：y=6.613x+0.0011，R2=0.9998；x为标准品浓度（μmol/mL），y为吸光值ΔA

1、按蛋白浓度计算

酶活定义：45°C，pH7.4时每毫克蛋白1min内催化产生1 nmol对硝基苯酚为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/ mg prot)} &= (\Delta A - 0.0011) \div 6.613 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 22.68 \times (\Delta A - 0.0011) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2、按样本质量计算：

酶活定义：45°C，pH7.4时每克样品1min内催化产生1 nmol对硝基苯酚为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A - 0.0011) \div 6.613 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times 1000 = 22.68 \times (\Delta A - 0.0011) \div W$$

3. 按细胞数量计算:

酶活定义: 45°C, pH7.4时每104个细胞1min内催化产生1 nmol对硝基苯酚为一个酶活单位。

β -木糖苷酶活性 (nmol/min/104cell) = $(\Delta A - 0.0011) \div 6.613 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量 (万个)} \div T \times 1000 = 22.68 \times (\Delta A - 0.0011) \div \text{细胞数量 (万个)}$

(4) 按液体体积计算

酶活定义: 45°C, pH7.4时每毫升液体1min内催化产生1 nmol对硝基苯酚为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/ mL)} &= (\Delta A - 0.0011) \div 6.613 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 \\ &= 22.68 \times (\Delta A - 0.0011) \end{aligned}$$

V样总: 加入提取液体积, 1mL; V反总: 反应总体积, 0.12mL; V样: 反应中样品体积, 0.04mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; T: 反应时间, 20min; 1000:1 μ mol/mL=1000nmol/mL

ΔA 控制在0.01-1范围内, 若 ΔA 大于1, 可适当减小样本量。

标准曲线线性范围为: 0.01 μ mol/mL-0.5 μ mol/mL。