

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℃保存。

试剂一：液体 1mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃保存。

试剂三：液体 10mL×1 瓶，4℃保存。

粗酶液提取：

1. 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℃，离心 20min，取上清待测。
2. 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℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 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℃水浴 20min		
试剂三 (μL)	80	80

混匀，静置 5min，405nm 处测定吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。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： $y = 13.226x + 0.0011$ ， $R^2 = 0.9998$ ；x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 为吸光值 ΔA 。

1、按蛋白浓度计算

酶活定义：45℃，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。

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

$$= 11.34 \times (\Delta A - 0.0011) \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算：

酶活定义：45℃，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℃，pH7.4 时每 10^4 个细胞 1min 内催化产生 1 nmol 对硝基苯酚为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/}10^4\text{cell)} = (\Delta A - 0.0011) \div 13.226 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量 (万个)}$$

$$\div T \times 1000 = 11.34 \times (\Delta A - 0.0011) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义：45℃，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。

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

$$= 11.34 \times (\Delta A - 0.0011)$$

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 $\mu\text{mol/L}$ =1000nmol/L

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 6.613x + 0.0011$ ， $R^2 = 0.9998$ ；x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 为吸光值 ΔA

1、按蛋白浓度计算

酶活定义：45℃，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。

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

$$= 22.68 \times (\Delta A - 0.0011) \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算：

酶活定义：45℃，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℃，pH7.4 时每 10^4 个细胞 1min 内催化产生 1 nmol 对硝基苯酚为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/}10^4\text{cell)} = (\Delta A - 0.0011) \div 6.613 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量 (万个)}$$

$$\div T \times 1000 = 22.68 \times (\Delta A - 0.0011) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义：45℃，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。

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

$$= 22.68 \times (\Delta A - 0.0011)$$

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; $1000:1\mu\text{mol/mL}=1000\text{nmol/mL}$

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: $0.01\mu\text{mol/mL}-0.5\mu\text{mol/mL}$ 。
