

β -木糖苷酶 (β -xylosidase) 测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

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、1 mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 2mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体 20mL×1 瓶，4℃保存。

试剂三：液体 20mL×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 (10^4 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:

	对照管	测定管
酶液 (μL)	200	200
试剂一 (μL)		50
试剂二 (μL)	400	350
混匀, 45°C水浴 20min		
试剂三 (μL)	400	400
混匀, 静置 5min, 蒸馏水调零, 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:

标准曲线: $y = 13.226x + 0.0011$, $R^2 = 0.9998$; 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。

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

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。

$$\begin{aligned} \beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= (\Delta A - 0.0011) \div 13.226 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量 (万个)} \\ &\div T \times 1000 = 11.34 \times (\Delta A - 0.0011) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

(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, 0.6mL; V 样: 反应中样品体积, 0.2mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; T: 反应时间, 20min; 1000: 1μmol/mL=1000nmol/mL

ΔA 控制在 0.01-2 范围内, 若 ΔA 大于 2, 可适当减小样本量。

标准曲线线性范围为: 0.01μmol/mL-0.5μmol/mL。