

β-木糖苷酶活性检测试剂盒说明书

β-xylosidase Assay Kit

微量法

货号：AK043

规格：100T / 48S

产品组成及保存条件：

	规格	储存条件
提取液 ES04	100mL×1 瓶	4℃保存
AK043-A	粉剂×2 支	-20℃保存
AK043-B	15mL×1 瓶	4℃保存
AK043-C	15mL×1 瓶	4℃保存
AK043-标准品 (5μmol/mL)	1 mL×1 支	4℃保存

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

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。

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。

自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂预配制：

AK043-A：临用前加入 0.5 mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂建议-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融（1 支粉剂溶解后可做 48S，为了延长使用时间，此产品多给 1 支粉剂）；

粗酶液提取：

1. 细菌或真菌样本：先收集样本到离心管内，离心后弃上清；按照样本数量（10⁴ 个）：提取液 ES04 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES04），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 植物样本：按照组织质量（g）：提取液 ES04 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 ES04），进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至405nm，分光光度计用蒸馏水调零。
2. 标准液的稀释：用 AK043-B 将标准液稀释至 0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 μmol/mL，备用。
3. 样本测定（在 EP 管或 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管(ul)	对照管(ul)	标准管(ul)	空白管(ul)
样本	40	40		
标准品			40	
AK043-A		10		

AK043-B	80	70	80	120
涡旋混匀, 45°C水浴 20 min				
AK043-C	80	80	80	80
混匀, 静置5min, 微量玻璃比色皿/96 孔板, 测定405nm 吸光值, 分别记为 A 对照、A 测定、A 空白、A 标准。并计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照、 ΔA 标准=A 标准-A 空白; 标准曲线和空白管只需测 1-2 次; 每个测定管需设一个对照管。				

β -木糖苷酶活性计算公式:

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

(1) 按蛋白浓度计算:

酶活定义: 45°C, pH7.4 时, 每毫克蛋白质 1min 内催化产生 $1\mu\text{mol}$ 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (U/mg prot)} = (y \times V \text{ 样}) \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 0.05 \times y \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本重量计算:

酶活定义: 45°C, pH7.4 时, 每克样品 1min 内催化产生 $1\mu\text{mol}$ 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (U/g)} = (y \times V \text{ 样}) \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.05 \times y \div W$$

(3) 按样本数量计算:

酶活定义: 45°C, pH7.4 时, 每 10^4 个细胞 1min 内催化产生 $1\mu\text{mol}$ 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (y \times V \text{ 样}) \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.0001 \times y$$

注: V 样总: 加入提取液体积, 1mL; 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; 500: 样本数量, 500 万; T: 反应时间, 20min。

注意事项:

1. 吸光度变化应该控制标曲范围内, 否则加大样品量或稀释样品, 并注意计算公式中参与计算的稀释倍数要相应改变。
2. 样品蛋白质含量需要另外测定, 可选用考马斯亮蓝法蛋白含量测定试剂盒进行测定。