

β-木糖苷酶(β-xylosidase) 活性测定试剂盒说明书

(货号: G0712W 微板法 48 样)

一、产品简介：

β-木糖苷酶(EC3.2.1.37)是一类重要的木聚糖降解水解酶,存在于植物、细菌和真菌等生物体,主要从非还原末端把木二糖和低聚木糖催化切割为木糖单体,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。

β-木糖苷酶催化对硝基苯酚-β-D-木糖苷产生对硝基苯酚(PNP),该产物在 405nm 处有特征吸收峰,通过测定 405nm 光吸收增加速率,即可计算β-木糖苷酶活性。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部,再加 1.4mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液 20 mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温离心机、天平、研钵、冰和蒸馏水。

四、β-木糖苷酶活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本的制备:

① 组织样本:取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.5g),加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1: 5~10 比例提取。

② 细菌或细胞:先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细菌或细胞,加入 1mL 提取液,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);12000rpm, 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】若增加样本量,可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例提取。

③ 液体样本:直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min,调节波长至 405nm。

② 在 EP 管中依次加入:

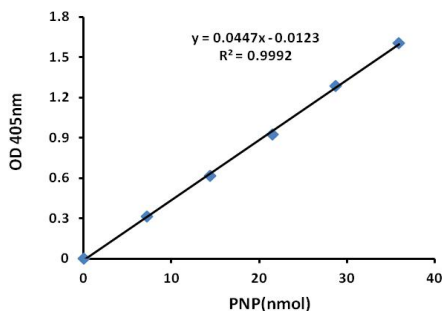
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	25	
蒸馏水		25
试剂二	35	35
迅速混匀, 45℃保温 20min		
试剂三	180	180

混匀，取 200 μ L 转移到 96 孔板中，405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定 - A 对照（每个测定管需设一个对照管）。

【注】：若 ΔA 低于 0.01，可增加样本取样量 V1（如增至 40 μ L，则试剂三相应减少），或延长保温时间（如：40min 或更长），或增加样本质量 W，则改变后的 V1 和 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0447x - 0.0123$ ；x 为标准品摩尔质量（nmol），y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：45 $^{\circ}$ C下，每毫克蛋白每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚（PNP）为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A + 0.0123) \div 0.0447 \div (V1 \times Cpr) \div T \\ = 56 \times (\Delta A + 0.0123) \div Cpr$$

3、按样本质量计算：

定义：45 $^{\circ}$ C下，每克组织每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚（PNP）为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0123) \div 0.0447 \div (V1 \div V \times W) \div T \\ = 56 \times (\Delta A + 0.0123) \div W$$

4、按细胞数量计算：

定义：45 $^{\circ}$ C下，每 10⁴ 个细胞每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚（PNP）为一酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = (\Delta A + 0.0123) \div 0.0447 \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \\ = 56 \times (\Delta A + 0.0123) \div \text{细胞数量}$$

5、按液体体积计算：

定义：45 $^{\circ}$ C下，每毫升液体每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚（PNP）为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A + 0.0123) \div 0.0447 \div V1 \div T \\ = 56 \times (\Delta A + 0.0123)$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入反应体系中样本体积，20 μ L=0.02mL；

W---样本质量，g； 500---细胞或细菌总数，500 万；

T---反应时间，20min； PNP 对分子质量---139.11。

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入：20 μ L 标准品+25 μ L 蒸馏水+35 μ L 试剂二+180 μ L 试剂三，混匀，取 200 μ L 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。