

## $\beta$ -木糖苷酶 ( $\beta$ -xylosidase) 检测试剂盒 (微量法)

**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：

$\beta$ -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， $\beta$ -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：

$\beta$ -木糖苷酶催化对硝基苯酚- $\beta$ -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 $\beta$ -木糖苷酶活性。

### 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：

- 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。
- 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。
- 液体：**直接检测。

### 测定步骤表：

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 ( $\mu$ L)	40	40
试剂一 ( $\mu$ L)		10
试剂二 ( $\mu$ L)	80	70
混匀，45℃ 水浴 20min		
试剂三 ( $\mu$ L)	80	80
混匀，静置 5min，405nm 处测定吸光值 A，计算 $\Delta A=A$ 测定管-A 对照管。每个测定管设一个对照管。		

**注意：空白管和标准管只需测定一次。**

### $\beta$ -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 ( $\mu$ mol/mL)，y 为吸光值 $\Delta A$ 。

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1nmol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1nmol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<sup>4</sup>个细胞1min内催化产生1nmol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1nmol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；

1000:1μmol/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，R<sup>2</sup>=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℃，pH7.4时每毫克蛋白1min内催化产生1nmol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1nmol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<sup>4</sup>个细胞1min内催化产生1nmol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1nmol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；

1000:1μmol/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：0.01μmol/mL-0.5μmol/mL。