

β-木糖苷酶活性检测试剂盒说明书

β-xylosidase Assay Kit

分光光度法

货号: AK042

规格: 50T / 24S

产品组成及保存条件:

	规格	储存条件
提取液 ES04	50mL×1 瓶	4°C保存
AK042-A	粉剂×1 支	-20°C保存
AK042-B	35mL×1 瓶	4°C保存
AK042-C	35mL×1 瓶	4°C保存
AK042-标准品 (5μmol/mL)	1 mL×1 支	4°C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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂预配制:

AK042-A: 临用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂建议-20°C分装保存 2 周, 避免反复冻融。

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°C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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测

测定步骤:

1. 分光光度计预热30min, 调节波长至405nm, 蒸馏水调零。
2. 标准液的稀释: 用 AK042-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	200	200		
标准品			200	
AK042-A	50			
AK042-B	350	400	400	600
混匀, 45°C水浴 20 min				

AK042-C	400	400	400	400
混匀，静置5min，测定405nm 吸光度，分别记为 A 对照、A 测定、A 空白、A 标准。并计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ 、 $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。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 $\Delta A_{标准}$ (x , $\Delta A_{标准}$)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{测定}$ (x , $\Delta A_{测定}$) 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。

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

(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： $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； $V_{\text{样}}$ ：反应中样品体积，0.2mL； C_{pr} ：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。