

## 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°C保存 |                                 |
| 试剂一  | 粉剂 mg×1 支   | 4°C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°C保存 |                                 |
| 试剂三  | 液 20 mL×1 瓶 | 4°C保存 |                                 |
| 标准品  | 粉剂×1 支      | 4°C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°C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°C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。

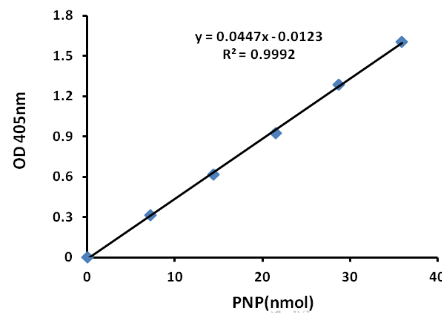
② 在 EP 管中依次加入:

| 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°C保温 20min |     |     |
| 试剂三                | 180 | 180 |

混匀，取 200 $\mu$ 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)。

## 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  $\Delta A$ 。



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 10<sup>4</sup> 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 $\mu$ 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 (2mg/mL)：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水。
- 2 把母液用蒸馏水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 $\mu$ L 标准品+25 $\mu$ L 蒸馏水+35 $\mu$ L 试剂二+180 $\mu$ L 试剂三，混匀，取 200 $\mu$ 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。