

β-木糖苷酶活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10476

规格: 100T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4°C保存

溶液的配制:

1. 试剂一: 临用前加入 1mL 蒸馏水。
2. 标准品: 5μmol/mL 对硝基苯酚溶液。

产品说明:

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。

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。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、水浴锅、蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 植物样本: 称取约 0.1g 样本, 加 1mL 提取液充分冰浴匀浆, 然后 12000rpm, 4°C, 离心 20min, 弃沉淀, 取 20μL 上清测定蛋白含量, 剩余上清作为待测酶液。
2. 细菌、真菌样本: 收集约 500 万个细胞, 加入 1mL 提取液, 超声波破碎 (冰浴, 功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 10000rpm, 4°C, 离心 10min, 弃沉淀, 取 20μL 上清测定蛋白含量, 剩余上清置于冰上待测。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热30min 以上, 调节波长至405nm, 蒸馏水调零。
- 2、标准液的处理: 用试剂二将标准液稀释至 0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625μmol/mL。
- 3、样本测定:

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	空白管	标准管
酶液	40	40		
标准品				40
试剂一		10		
试剂二	80	70	120	80
混匀, 45°C水浴20min				
试剂三	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 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ 、 $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。				

三、β-木糖苷酶活性计算

根据标准管的吸光度 $\Delta A_{标准}$ (x) 和浓度 (y, μmol/mL) 建立标准曲线, 将 $\Delta A_{测定}$ 带入标准曲线中, 计算样本生成的产物量y (μmol/mL)。

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 45°C, pH7.4 时, 每毫克蛋白质 1min 内催化产生 1μmol 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、按样本质量计算:

酶活定义: 45°C, pH7.4 时, 每克样本 1min 内催化产生 1μmol 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

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

3. 按细胞数量计算:

酶活定义: 45°C, pH7.4 时, 每 10⁴ 个细胞 1min 内催化产生 1μmol 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

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

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; V样: 加入反应体系中样本体积, 0.04mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500万; T: 反应时间, 20min。

注意事项:

- 1、吸光度变化应该控制在 0.05~0.6 之间。否则加大样本量或稀释样本, 注意计算公式中参与计算的稀释倍数要相应改变。
- 2、样本蛋白质含量需要另外测定。