

## β-木糖苷酶 (β-xylosidase) 测定试剂盒说明书

微量法 100T/48S

**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：

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。

### 测定原理：

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。

### 自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

### 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：

1. 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。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10<sup>4</sup> 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。
3. 液体：直接检测。

### 测定操作表：

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

**β-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<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 1 nmol 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 1 nmol 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 1 nmol 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 1 nmol 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 1 nmol 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 1 nmol 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 1 nmol 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 1 nmol 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：0.01 $\mu$ mol/mL-0.5 $\mu$ mol/mL。