

上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0436

Size: 100T/48S

## $\beta$ -木糖苷酶检测试剂盒说明书

### 微量法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 一、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。

#### 二、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。

#### 三、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、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

#### 四、试剂的组成和配置：

| 种类  | 试剂规格         | 储存条件   | 使用方法及注意事项 |
|-----|--------------|--------|-----------|
| 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   |           |

#### 五、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（ $10^4$ 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。

3. 液体：直接检测。

## 六、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（ $\mu\text{L}$ ）                                   | 40  | 40  |
| 试剂一（ $\mu\text{L}$ ）                                  |     | 10  |
| 试剂二（ $\mu\text{L}$ ）                                  | 80  | 70  |
| 混匀，45℃水浴 20min                                        |     |     |
| 试剂三（ $\mu\text{L}$ ）                                  | 80  | 80  |
| 混匀，静置 5min，微量石英比色皿/96 孔板，对照管调零，测定 405nm 吸光值，记为 A 405。 |     |     |

## 七、 $\beta$ -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： $y=3.34x-0.001$ ， $R^2=0.9991$

1、按蛋白浓度计算酶活定义：45℃，pH7.4 时，每毫克蛋白质 1min 内催化产生 1nmol 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

$\beta$ -木糖苷酶活性（nmol/min/mg prot）=  $(A_{405}+0.001) \div 3.34 \div 138 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 = 542.4 \times (A_{405}+0.001) \div C_{\text{pr}}$

2、按样本重量计算：

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

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/g)} = (A_{405} + 0.001) \div 3.34 \div 138 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times 1000 = 542.4 \times (A_{405} + 0.001) \div W$$

### 3. 按细胞数量计算:

酶活定义: 45°C, pH7.4 时, 每  $10^4$  个细胞 1min 内催化产生 1nmol 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/10}^4\text{ cell)} = (A_{405} + 0.001) \div 3.34 \div 138 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量 (万个)} \div T \times 1000 = 542.4 \times (A_{405} + 0.001) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

### 4. 按液体体积计算

酶活定义: 45°C, pH7.4 时, 每毫升液体 1min 内催化产生 1nmol 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/mL)} = (A_{405} + 0.001) \div 3.34 \div 138 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 = 542.4 \times (A_{405} + 0.001)$$

V 样总: 加入提取液体积, 1mL; V 反总: 反应总体积, 0.2mL; V 样: 反应中样品体积, 0.04mL; 138: 对硝基苯酚分子量; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; T: 反应时间, 20min; 1000: 1mmol/L=1000  $\mu$ mol/L

### b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线:  $y = 1.67x - 0.001$ ,  $R^2 = 0.9991$

#### (1) 按蛋白含量计算

酶活定义: 45°C, pH7.4 时, 每毫克蛋白质 1min 内催化产生 1nmol 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/mg prot)} = (A_{405} + 0.001) \div 3.34 \div 138 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 = 1084.8 \times (A_{405} + 0.001) \div C_{\text{pr}}$$

## (2) 按样本重量计算：

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

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/g)} = (A_{405} + 0.001) \div 3.34 \div 138 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times 1000 = 1084.8 \times (A_{405} + 0.001) \div W$$

## (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 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = (A_{405} + 0.001) \div 3.34 \div 138 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量 (万个)} \div T \times 1000 = 1084.8 \times (A_{405} + 0.001) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

## (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 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (nmol/min/mL)} = (A_{405} + 0.001) \div 3.34 \div 138 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 = 1084.8 \times (A_{405} + 0.001)$$

V 样总：加入提取液体积，1mL；V 反总：反应总体积，0.2mL；V 样：反应中样品体积，0.04mL；138：对硝基苯酚分子量；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样品质量，g；T：反应时间，20min；1000：1mmol/L=1000 μmol/L

## 八、注意事项：

- 1、吸光度变化应该控制在 0.01~0.8 之间。否则加大样品量或稀释样品，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，建议使用本公司考马斯亮蓝法蛋白含量检测试剂盒（ZC-S0749）进行测定。