

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-S0714

Size: 50T/24S

β -木糖苷酶检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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：

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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品：

天平、低温离心机、可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

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 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 2mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	
标准液	液体 1ml×1 支	4℃保存	10mol/ml 对硝基苯酚溶液

五、操作步骤：

● 粗酶液提取

1. 植物样本：称取约 0.1g 样品，加 1.0 mL 提取液充分冰浴匀浆，然后 12000rpm，4℃，离心 20min，弃沉淀，取 20 μL 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 1.0 mL 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℃，离心 10min，弃沉淀，取 20 μL 上清测定蛋白含量，剩余上清置于冰上待测。
3. 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、0.00625、0mol/ml。

● 测定操作表

	对照管	测定管	标准管
酶液（μL）或标准液	200	200	200
试剂一（μL）		50	
试剂二（μL）	400	350	400
混匀，45℃水浴 20min			
试剂三（μL）	400	400	400
混匀，静置 5min，1mL 玻璃比色皿，蒸馏水调零，测定 A405。△A=A 测-A 对照			

六、β-木糖苷酶活性计算公式

根据标准管的吸光度（x）和浓度（y，mol/ml）建立标准曲线，将△A 带入标准曲线中，计算样品生成的产物量（mol/ml）。

1. 按蛋白含量计算

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

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (mol/min / mg prot)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.25 \times y \div C_{\text{pr}}$$

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 μmol 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (mol/min /g)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.25 \times y \div W$$

3. 按细胞数量计算：

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

$$\beta\text{-木糖苷酶活性 (mol/min /10}^4\text{cell)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.0005 \times y$$

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；V 反总：反应体系总体积，1mL；V 样：加入反应体系中样本体积，0.2mL；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。

七、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，可选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。