

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

β-木糖苷酶检测试剂盒说明书

微量法

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：

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	

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(10⁴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°C水浴 20min		
试剂三 (μL)	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 。		

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: $y=3.34x-0.001$, $R^2=0.9991$

1、按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。

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

2、按样本重量计算:

酶活定义: 45°C, 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10⁴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; C_{pr}: 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

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°C, 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°C，pH7.4时，每10⁴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°C，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

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，可选用考马斯亮蓝法蛋白含量测定试剂盒进行测定。