**β-木糖苷酶活性检测试剂盒（可见分光光度法）**

**产品货号：**BA1027

**产品规格：**50管/24样

**产品内容：**

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。

试剂三：液体35mL×1瓶，4℃保存。

标准液：液体1ml×1支，4℃保存，10μmol/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。

**需自备的仪器和用品：**

天平、低温离心机、可见分光光度计、1 mL玻璃比色皿和蒸馏水。

**操作步骤：**

**一、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20μL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、0 mol/ml。

二、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  |

**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（μmol/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1μmol对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

β-木糖苷酶活性（μmol/min / mg prot）=(y×V反总)÷(V样×Cpr)÷T=0.25×y÷Cpr

**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1μmol对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

β-木糖苷酶活性（μmol/min /g）＝(y×V反总)÷(W×V样÷V样总)÷T=0.25×y÷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1μmol对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

β-木糖苷酶活性（μmol/min /104cell）= (y×V反总)÷(500×V样÷V样总)÷T=0.0005×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。

**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，可选用考马斯亮蓝法蛋白含量测定试剂盒进行测定。