

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-S0433

Size: 100T/48S

中性木聚糖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：

木聚糖酶(EC 3.2.1.8)主要由微生物产生，能催化水解木聚糖，也被称为戊聚糖酶或半纤维素酶，可分解酿造或饲料工业中的原料细胞壁以及 β -葡聚糖，降低酿造中物料的粘度，促进有效物质的释放，以及降低饲料中的非淀粉多糖，促进营养物质的吸收利用，因而广泛的应用于酿造和饲料工业中，中性木聚糖酶(NEX)一般分离自最适生长 pH 为 6-8 的微生物。

二、测定原理：

NEX 在中性环境中催化木聚糖降解成还原性寡糖和单糖，在沸水浴条件下进一步与 3,5-二硝基水杨酸发生显色反应，在 540nm 处有特征吸收峰，反应液颜色的深浅与酶解产生的还原糖量成正比，通过测定反应液在 540nm 吸光值增加速率，可计算 NEX 活力。

三、需自备的仪器和用品：

低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

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
缓冲液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4°C 避光保存	
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4°C 避光保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C 保存	10mg 木糖，临用前加入 667 μ L 蒸馏水配成 100 μ mol/mL 的标品溶液，再稀释 25 倍即得 4 μ mol/mL 的木糖标准溶液，备用

五、操作步骤：

● 粗酶液提取：

1、细胞或微生物样品发酵液的制备：

发酵液于 8000rpm, 4°C, 离心 15min, 取上清, 置于冰上待测。

2、组织：

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 缓冲液, 冰上充分研磨。8000g, 4°C离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

3、酶干粉：

称约 1mg, 加缓冲液 1mL, 震荡充分溶解。

● 测定步骤：

1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。

2、将组织上清液/酶溶液用蒸馏水稀释十倍后置冰上待测。

3、操作表：

加入试剂	对照管	测定管	标准管	空白管
样品 (μL)	50	50		
标准品 (μL)			50	
蒸馏水 (μL)				50
缓冲液 (μL)	75	75	75	75
试剂一 (μL)	-	50	50	50
混匀, 盖紧瓶盖, 50°C水浴, 反应 30min, 立即沸水浴 10min 灭活。(注意不要让盖子爆开, 以免进水, 改变了反应体系)				
试剂一 (μL)	50	-		

试剂二 (μL)	75	75	75	75
混匀，沸水浴显色 5min(注意不要让盖子爆开，以免进水改变了反应体系)，冰浴冷却后吸取 200 μL 至 96 孔板/比色皿中，尽快测量 540nm 波长下的吸光值 A 对照管、A 测定管、A 标准管、A 空白管，计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。				

六、NEX 计算公式

● 发酵液 NEX 活力计算：

酶活定义：50°C，pH 6.0 条件下每毫升发酵液每分钟分解木聚糖产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{NEX 活力 (U/mL)} = [\Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准})] \div T = 0.13 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}$$

● 酶干粉 NEX 活力计算：

酶活定义：50°C，pH 6.0 条件下，每毫克酶每分钟分解木聚糖产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{NEX 活力 (U/mg)} = [\Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准})] \times V \text{ 样品} \times 10 \div (V \text{ 样品} \times W \text{ 酶} \div V \text{ 提取}) \div T = 1.33 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \text{ 酶}$$

● 组织中 NEX 活力的计算：

(1) 按样品蛋白浓度计算：

酶活定义：50°C，pH 6.0 条件下，每 mg 组织蛋白每分钟分解木聚糖产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{NEX 活力 (U/mg prot)} = [\Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准})] \times V \text{ 样品} \times 10 \div (V \text{ 样品} \times C_{pr}) \div T = 1.33 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div C_{pr}$$

(2) 按样品鲜重计算：

酶活定义：50°C，pH 6.0 条件下，每 g 组织每分钟分解木聚糖产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{NEX 活力 (U/g 鲜重)} = [\Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准})] \times V \text{ 样品} \times 10 \div (V \text{ 样品} \times W \div V)$$

提取) $\div T = 1.33 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$ 。

C 标准: 木糖标准溶液, $4 \mu\text{mol/mL}$; V 样品: 加入的样品体积, 0.05mL ; W 酶: 酶干粉的质量, mg ; T: 反应时间, 30min ; Cpr: 样品蛋白浓度, mg/mL ; W: 组织样品鲜重, g ;
V 提取: 提取液体积, 1mL ; 10: 样品稀释倍数。

七、注意事项:

吸光度变化应该控制在 $0.01 \sim 1.5$ 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; 也可以延长或者缩短反应时间。