

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-S0434

Size: 100T/48S

酸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，酸性木聚糖酶 (ACX) 一般分离自耐酸的真菌，细菌及部分霉菌。

二、测定原理：

ACX 在酸性环境下能将木聚糖降解成还原性寡糖和单糖，进一步在沸水浴条件下与 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 ACX 活力。

三、需自备的仪器和用品：

天平、低温离心机、恒温水浴锅，可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/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
缓冲液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 7mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	10mg 木糖，临用前加入 667μL 蒸馏水溶解，得到 100μmol/mL 木糖溶液，蒸馏水稀释 50 倍得到 2μmol/mL 木糖标准溶液

五、操作步骤：

1. 粗酶液提取

- 1) 发酵液：发酵液于 8000rpm, 4℃, 离心 15min, 取上清, 作为待测样品。
- 2) 酶干粉：称约 1mg, 加 1mL 缓冲液溶解, 蒸馏水稀释 10 倍待测。
- 3) 组织样品：称约 0.1g 组织, 加入 1mL 缓冲液, 冰上充分研磨。8000rpm, 4℃, 离心 15min, 取上清蒸馏水稀释 10 倍待测。

2. 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) 样本测定（在 EP 管中加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	空白管	标准管
样品	60	60	—	—
2μmol/mL 木糖标准品	—	—	—	60
蒸馏水	—	—	60	—
缓冲液	90	90	90	90
试剂一	—	60	60	60
混匀，50℃水浴中反应 30min，立即沸水浴中 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	60	—	—	—
试剂二	90	90	90	90
试剂三	30	30	30	30
混匀，沸水浴中显色 5min（注意不要让盖子爆开，以免进水改变了反应体系），冷却后吸取 200μL 至 96 孔板或比色皿中，尽快测定各管 540nm 下的吸光度，分别记为 A 测定、A 对照、A 标准、A 空白。				

六、ACX 活性计算：

1. 发酵液 ACX 活力计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 条件下，每毫升发酵液每分钟分解木聚糖产生 1μmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

ACX 活力 (U/mL) = C 标准 × (A 测定 - A 对照) ÷ (A 标准 - A 空白) ÷ T = 0.067 × (A 测定 - A 对照) ÷ (A 标准 - A 空白)

C 标准：木糖标准溶液浓度，2μmol/mL；T：反应时间，30min。

2. 酶干粉 ACX 活力计算:

酶活定义: 50℃, pH4.8 条件下, 每毫克酶每分钟分解木聚糖产生 1μmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (U/mg)} = 10 \times C \text{ 标准} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times V \text{ 提取} \div W_1 \div T \\ = 0.67 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W_1$$

10: 样本稀释倍数, 10 倍; C 标准: 木糖标准溶液浓度, 2μmol/mL; V 提取: 加入缓冲液体积, 1mL; W₁: 酶干粉重量, mg; T: 反应时间, 30min。

3. 组织中 ACX 活力计算:

(1) 按样品蛋白浓度计算:

酶活定义: 50℃, pH4.8 条件下, 每 mg 组织蛋白每分钟分解木聚糖产生 1μmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (U/mg prot)} = 10 \times C \text{ 标准} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times V \text{ 样} \\ \text{品} \div (V \text{ 样品} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.67 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样品鲜重计算:

酶活定义: 50℃, pH4.8 条件下, 每克组织每分钟分解木聚糖产生 1μmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (U/g 鲜重)} = 10 \times C \text{ 标准} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times V \text{ 提取} \div \\ W_2 \div T = 0.67 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W_2$$

10: 样本稀释倍数, 10 倍; C 标准: 木糖标准溶液浓度, 2μmol/mL; V 提取: 加入缓冲液体积, 1mL; W₂: 样本鲜重, g; T: 反应时间, 30min; C_{pr}: 样品蛋白浓度, mg/mL; V 样品: 加入的样品体积, 0.06mL。

七、注意事项：

吸光度变化应该控制在 0.01~1.5 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