

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-S0713

Size: 50T/24S

碱性木聚糖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：

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，碱性木聚糖酶 (BAX) 一般分离自最适生长 pH 为 9-11 的微生物。

二、测定原理：

BAX 在碱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 BAX 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	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	10mg 木糖。临用前加入 667μL 蒸馏水配制成 100μmol/mL 的木糖标准液。再稀释 50 倍即 2μmol/mL 的木糖标准溶液备用

五、操作步骤：

● 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, 8000rpm, 4℃, 离心 15min, 取上清蒸馏水稀释 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。

● 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 (μL)	60	60	—	—
2μmol/mL 木糖标准品	—	—	—	60
蒸馏水	—	—	60	—
缓冲液 (μL)	90	90	90	90
试剂一 (μL)	—	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 (μL)	60	—	—	—
试剂二 (μL)	90	90	90	90
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 于 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、BAX 活性计算：

(1) 发酵液 BAX 活力计算：

酶活定义：50℃，pH 9.0 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碱性木聚糖酶的活力单位。

BAX 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 BAX 活力计算:

酶活定义: 50°C, pH 9.0 条件下, 每毫克酶每分钟分解木聚糖产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{BAX 活力 (U/mg)} = 10 \times C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{提取}} \div W_1 \div T \\ = 0.67 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W_1$$

10: 样本稀释倍数, 10 倍; C 标准: 木糖标准溶液浓度, 2 μ mol/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 BAX 活力计算:

酶活定义: 50 °C, pH 9.0 条件下, 每 mg 组织蛋白每分钟分解木聚糖产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (U/mg prot)} = 10 \times C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{样品}} \div (V_{\text{样品}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

(4) 按样品鲜重计算:

酶活定义: 50°C, pH 9.0 条件下, 每克组织每分钟分解木聚糖产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{BAX 活力 (U/g 鲜重)} = 10 \times C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{提取}} \div W_2 \div T = 0.67 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W_2$$

10: 样本稀释倍数, 10 倍; C 标准: 木糖标准溶液浓度, 2 μ mol/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：

1. 吸光度变化应该控制在 0.01~1.2 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. 试剂盒 2-8℃保存，保质期 3 个月，建议尽快使用。