

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

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

产品内容：

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 5mL×1 瓶	4℃避光保存	-
试剂二	液体 8mL×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 667 μL 蒸馏水配成 100 μmol/mL 的标品溶液，再稀释 25 倍即得 4 μmol/mL 的木糖标准溶液，备用

产品说明：

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。

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。

试验中所需的仪器和试剂：

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。

操作步骤：

一、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℃, 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℃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。

二、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。				

三、NEX 计算公式

a. 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。

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

b. 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。

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

$$= 1.33 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \text{ 酶}。$$

c. 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。

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

$$= 1.33 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W。$$

C 标准：木糖标准溶液，4 μmol/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。

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；也可以延长或者缩短反应时间。