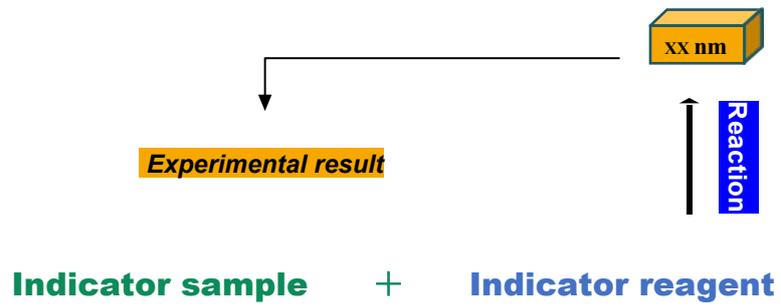


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

碱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

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，BAX 一般分离自最适生长pH为9-11的微生物。

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。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、恒温水浴锅，可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
缓冲液	液体 65mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	-
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	-

粗酶提取：

1. 发酵液：发酵液于8000g，4℃，离心15min，取上清，作为待测样品。
2. 酶干粉：称约 0.1mg，加缓冲液1mL，震荡溶解待测。

测定操作表：

- 1、分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至540nm。

2、操作表

	对照管	测定管
样品 (μL)	60	60
缓冲液 (μL)	90	90
试剂一 (μL)		60
试剂二 (μL)	90	
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)	60	
试剂二 (μL)		90
混匀, 沸水浴显色 5min, 取 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板中, 对照管调零, 测定 A ₅₄₀ 。		

BAX 计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y=2.8432x-0.0293$, $R^2=0.9985$

1. 发酵液 BAX 活力计算

酶活定义: 50°C, pH9.0条件下, 每毫升发酵液每分钟分解木聚糖产生1nmol还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mL)} &= (A_{540}+0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 1000 \\ &= 391 \times (A_{540}+0.0293) \end{aligned}$$

2. 酶干粉 BAX 活力计算

酶活定义: 50°C, pH9.0条件下, 每毫克酶每分钟分解木聚糖产生1nmol还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mg)} &= (A_{540}+0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 1000 \div W \\ &= 391 \times (A_{540}+0.0293) \div W \end{aligned}$$

150: 木糖的分子量; T: 反应时间, 30min; 稀释倍数= $V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}}=300\mu\text{L} \div 60\mu\text{L}=5$; 1000: 转化因子, 即 $1\text{mmol/L}=1000\mu\text{mol/L}$; W: 样品质量: mg

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y=1.4216x-0.0293$, $R^2=0.9985$

1. 发酵液 BAX 活力计算

酶活定义: 50°C, pH9.0条件下, 每毫升发酵液每分钟分解木聚糖产生1nmol还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mL)} &= (A_{540}+0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 1000 \\ &= 782 \times (A_{540}+0.0293) \end{aligned}$$

2. 酶干粉 BAX 活力计算

酶活定义: 50°C, pH9.0 条件下, 每毫克酶每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mg)} &= (A_{540}+0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 1000 \div W \\ &= 782 \times (A_{540}+0.0293) \div W \end{aligned}$$

150: 木糖的分子量; T: 反应时间, 30min; 稀释倍数= $V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}}=300\mu\text{L} \div 60\mu\text{L}=5$; 1000: 转化因子, 即 $1\text{mmol/L}=1000\mu\text{mol/L}$; W: 样品质量: mg

注意事项:

1. 吸光度变化应该控制在0.01~0.8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。
2. 试剂盒2-8°C保存，保质期3个月，建议尽快使用。