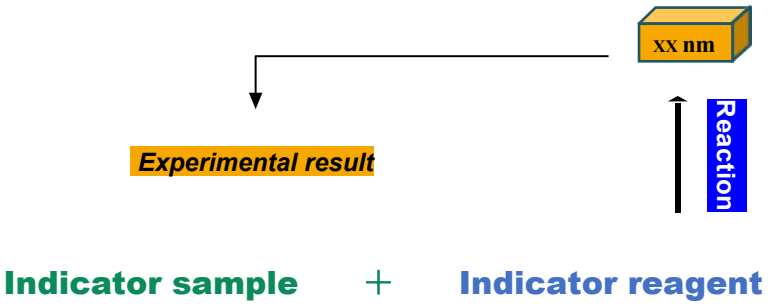
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0677　　规格：50管/24样

中性蛋白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

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 50mL×1 瓶	4℃保存	–
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	–
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	–
标准品	粉剂×1	4℃保存	10mg 木糖，临用前加入 667μL 蒸馏水配成 100μmol/mL 的标品溶液，再稀释 50 倍即得 2μmol/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、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、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、 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

2、 将上清液/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）	200	200		
标准溶液（μL）			200	
蒸馏水（μL）				200
缓冲液（μL）	300	300	300	300
试剂一（μL）	–	200	200	200
混匀，盖紧瓶盖，50℃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）	200	–		
试剂二（μL）	300	300	300	300
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

1 发酵液 NEX 活力计算：

酶活定义：50℃，pH 6.0 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中性木聚糖酶的活力单位。

NEX 活力（U/mL）=[ΔA 测定÷(ΔA 标准÷C 标准）]÷T=0.067×ΔA 测定÷ΔA 标准

2 酶干粉 NEX 活力计算：

酶活定义：50℃，pH 6.0 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中性木聚糖酶的活力单位。

NEX 活力（U/mg）=[ΔA 测定÷(ΔA 标准÷C 标准）] ×V 样品×10÷(V 样品×W 酶÷V 提取）÷T

=0.67×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W 酶。

3 组织中 NEX 活力的计算：

（1）按样品蛋白浓度计算：

酶活定义：50℃，pH 6.0 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中性木聚糖酶的活力单位。

NEX 活力（U/mg prot）=[ΔA 测定÷(ΔA 标准÷C 标准）] ×V 样品×10÷(V 样品×Cpr)÷T

=0.67×ΔA 测定÷ΔA 标准÷Cpr。

（2）按样品鲜重计算：

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

NEX 活力（U/g 鲜重）=[ΔA 测定÷(ΔA 标准÷C 标准）] ×V 样品×10÷(V 样品×W÷V 提取）÷T

=0.67×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W。

C 标准：木糖标准溶液，2μmol/mL；V 样品：加入的样品体积，0.2mL；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：

1.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。

2.试剂盒 2-8℃保存，保质期 3 个月，建议尽快使用