

碱性木聚糖酶/碱性半纤维素酶活性检测试剂盒 (微量法)
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0566	碱性木聚糖酶/碱性半纤维素酶活性检测试剂盒 (微量法)	100 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
缓冲液	液体 65mL × 1 瓶	4℃
试剂一	液体 10mL × 1 瓶 (若出现白色絮状或颗粒状沉淀, 可 60℃ 加热溶解后使用)	4℃, 避光
试剂二	液体 10mL × 1 瓶	4℃, 避光

一、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碱的原料细胞壁以及 β -葡聚糖, 降低酿造碱物料的粘度, 促进有效物质的释放, 以及降低饲料碱的非淀粉多糖, 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碱, BAX 一般分离自最适生长 pH 为 9+11 的微生物。

BAX 在碱性环境碱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。

二、自备材料

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。

三、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。
- 2、酶干粉: 称约 0.1mg, 加 1mL 缓冲液溶解待测。
- 3、组织样本: 按照组织质量 (g) : 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 缓冲液) 进行冰浴匀浆, 然后 8000g, 4℃, 离心 10min, 取上清待测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。
- 2、操作表:

试剂名称 (μ L)	对照管	测定管
样本	60	60
缓冲液	90	90
试剂一		60
试剂二	90	

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	60	
试剂二		90

混匀, 沸水浴显色 5min, 取 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板中 540nm 处测定吸光值 A, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个对照管。

五、酶活的计算

A. 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、按照蛋白浓度计算

酶活定义: 50℃, pH9.0 条件下, 每毫克蛋白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。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 782 \times (\Delta A + 0.0293) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、按照样本鲜重计算

酶活定义: 50℃, pH9.0 条件下, 每克样本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。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W \\ &= 782 \times (\Delta A + 0.0293) \div W \end{aligned}$$

3、按照液体体积计算

酶活定义: 50℃, pH9.0 条件下, 每毫升液体样本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。

$$\text{BAX 活力 (nmol/min/mL)} = (\Delta A + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6$$

150: 木糖的分子量; T: 反应时间, 30min; 稀释倍数 = $V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} = 300\mu\text{L} \div 60\mu\text{L} = 5$;

10^6 : 转化因子, 即 $1\text{mg/mL} = 10^6\text{ng/mL}$; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。

B. 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、按照组织蛋白浓度计算

酶活定义: 50℃, pH9.0 条件下, 每毫克蛋白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。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、按照样本鲜重计算

酶活定义: 50℃, pH9.0 条件下, 每克样本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。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \div W \end{aligned}$$

3、按照血清/血浆体积计算

酶活定义: 50℃, pH9.0 条件下, 每毫升液体样本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。

$$\text{BAX 活力 (nmol/min/mL)} = (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6$$
$$= 391 \times (\Delta A + 0.0293)。$$

150: 木糖的分子量; T: 反应时间, 30min; 稀释倍数=V 反总÷V 样=300μL÷60μL=5;
10⁶: 转化因子, 即 1mg/mL=10⁶ng/mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。

六、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、由试剂盒 2+8℃ 保存, 保质期 3 个月, 建议尽快使用。