

半纤维素酶/木聚糖酶测定试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介：

半纤维素酶主要检测木聚糖酶活力,可将木聚糖降解成低聚糖和木糖的一组酶的总称,广泛应用于酿造和饲料工业中。

半纤维素酶在酸性下将木聚糖降解成还原性寡糖和单糖,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,即可计算该酶活力大小。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	60mL 液体×1 瓶	4°C保存	
试剂一	25mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加 12.5mL 试剂一溶解备用。
试剂三	21mL×1 瓶	-20°C保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、低温离心机、恒温水浴锅、可调式移液器。

四、半纤维素酶活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备：

- ① 组织样本：称取约 0.2g 组织(水分充足的样本可取 1g),加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆,4°C放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 5min; 弃上清,留沉淀,向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀,4°C放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 5min; 弃上清,留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液,涡旋混匀,4°C放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 10min; 留上清,弃沉淀。上清液置冰上待测。
- ② 细菌/培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 20%或 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次); 12000rpm, 4°C离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500:1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本：澄清液体直接检测,若浑浊则 12000rpm, 4°C,离心 15min,取上清待测。

2、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30min,调节波长至 540nm,蒸馏水调零。
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	100	100
试剂二	100	
40°C孵育60min		
试剂二		100
试剂三	200	200
混匀,沸水浴(95-100°C)5min,冷却至室温		
蒸馏水	200	200

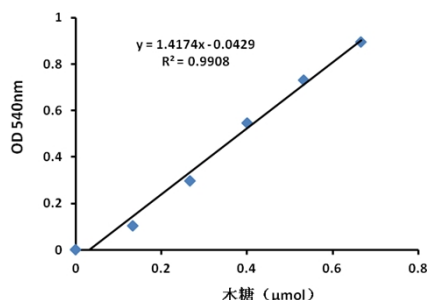
混匀，取出全部澄清液体至1mL玻璃比色皿（光径1cm）中，于540nm处读取A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管设一个对照管）。

【注】1. 若A值大于1.5，最后一步检测时可进行稀释：如取350 μ L待检液至比色皿中，再加350 μ L蒸馏水，相当于稀释倍数D为2，需带入计算公式参与计算。

2. 若 ΔA 小于0.01，则可增加样本加样体积V1（如增至200 μ L，则试剂一减少为0 μ L），则改变后的V1代入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 1.4174x - 0.0429$ ，x是标准品摩尔质量（ μ mol），y是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟分解木聚糖产生1nmol木糖所需酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0429) \div 1.4174 \times 10^3] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

3、按样本重量计算：

酶活定义：每克样本每分钟分解木聚糖产生1nmol木糖所需酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0429) \div 1.4174 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每1万个细菌/细胞每分钟分解木聚糖产生1nmol木糖所需酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0429) \div 1.4174 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \div 500 \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体样本每分钟分解木糖产生1nmol木糖所需酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0429) \div 1.4174 \times 10^3] \div V1 \div T \times D \\ &= 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \times D \end{aligned}$$

V--提取液体积，1mL； V1--样本体积，0.1mL； T--反应时间，60min；

W--样本质量，g； 500--细胞数量，万； 木糖分子量--150.131； D--稀释倍数，未稀释即为1；

Cpr--样本蛋白质浓度，mg/mL； 建议使用本公司的BCA蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（5mg/mL）：向标准品EP管里面加入1mL蒸馏水（母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。
- 3 100 μ L标准品+100 μ L试剂一+100 μ L蒸馏水+200 μ L试剂三，混匀，沸水浴（95-100 $^{\circ}$ C）5min，冷却至室温，再加200 μ L蒸馏水，混匀后取出全部液体至1mL玻璃比色皿（光径1cm）中，于540nm处读取吸光值A。根据结果即可制作标准曲线。