

碱性木聚糖酶 (Basic Xylanase, BAX) 测定试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介:

木聚糖酶在自然界分布广泛,可从动物、植物和微生物中获得。可将木聚糖降解成低聚糖和木糖的一组酶的总称,也被称为戊聚糖酶或半纤维素酶,广泛应用于酿造和饲料工业中。

碱性木聚糖酶(BAX)在中性环境中水解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3,5-二硝基水杨中发生显色反应,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、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、碱性木聚糖酶(BAX)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。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		

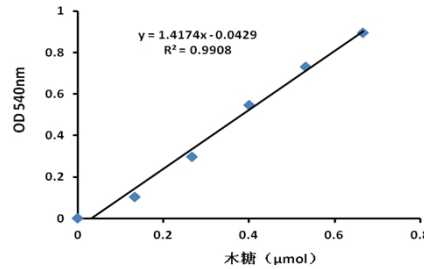
蒸馏水	200	200
混匀，取出全部澄清液体至1mL玻璃比色皿（光径1cm）中，于540nm处读取A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管设一个对照管）。		

【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、按蛋白浓度计算：

酶活定义：40 $^{\circ}$ C，PH9.0 条件下，每毫克蛋白每分钟分解木聚糖产生 1nmol 木糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{BAX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0429) \div 1.4174 \times 10^3] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \div \text{Cpr} \times D$$

3、按鲜重计算：

酶活定义：40 $^{\circ}$ C，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。

$$\text{BAX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0429) \div 1.4174 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \div W \times D$$

4、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：40 $^{\circ}$ C，PH9.0 条件下，每 1 万个细菌或细胞每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{BAX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0429) \div 1.4174 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \div 500 \times D$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：40 $^{\circ}$ C，PH9.0 条件下，每毫升液体样本每分钟分解木聚糖产生 1nmol 木糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{BAX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0429) \div 1.4174 \times 10^3] \div V1 \div T \times D = 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \times D$$

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。