

半纤维素酶/木聚糖酶测定试剂盒说明书

(微板法 96 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 | 100mL 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:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、恒温水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

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、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 酶标仪预热 30min,调节波长至 540nm。
- ② 在 EP 管中依次加入:

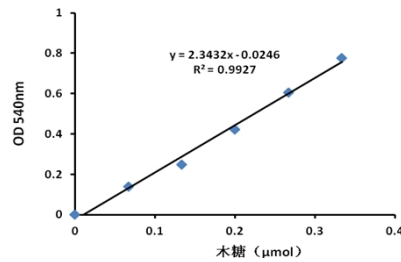
| 试剂名称(μL) | 测定管 | 对照管 |
|-------------|-----|-----|
| 样本 | 50 | 50 |
| 试剂一 | 50 | 50 |
| 试剂二 | 50 | |
| 40°C孵育60min | | |
| 试剂二 | | 50 |
| 试剂三 | 100 | 100 |

| | | |
|--|-----|-----|
| 混匀，沸水浴（95-100℃）5min，冷却至室温 | | |
| 蒸馏水 | 100 | 100 |
| 混匀，取出200μL待检液至96孔板中，于540nm处读取吸光值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 100μL 待检液至 96 孔板中，再加 100μL 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 100μL，则试剂一减少为 0μL），则改变后的 V1 代入公式计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 2.3432x - 0.0246$ ，x 是标准品摩尔质量（μmol），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力单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0246) \div 2.3432 \times 10^3] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 142.3 \times (\Delta A + 0.0246) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

- 3、按样本鲜重计算：

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力单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0246) \div 2.3432 \times 10^3] \div (\text{W} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 142.3 \times (\Delta A + 0.0246) \div \text{W} \times D \end{aligned}$$

- 4、按细菌/细胞密度计算：

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

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0246) \div 2.3432 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 142.3 \times (\Delta A + 0.0246) \div 500 \times D \end{aligned}$$

- 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力单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0246) \div 2.3432 \times 10^3] \div V1 \div T \times D \\ &= 142.3 \times (\Delta A + 0.0246) \times D \end{aligned}$$

V--提取液体积，1mL； V1--样本体积，0.05mL； T--反应时间，60min；

W--样本质量，g； 木糖分子量--150.131； 500--细胞数量，万； 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℃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 50μL 标准品+50μL 试剂一+50μL 蒸馏水+100μL 试剂三，混匀，沸水浴（95-100℃）5min，冷却至室温，再加 100μL 蒸馏水，混匀后取出 200μL 液体至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A。根据结果即可制作标准曲线。