

木聚糖酶检测试剂盒(DNS微板法)

产品简介

木聚糖(Xylan)是植物细胞壁的主要组成成分，它也是可利用的丰富的半纤维素。木聚糖酶(Xylanase)指能专一降解半纤维素、木聚糖为低聚木糖和木糖的一组酶的总称。木聚糖酶主要来源于细菌和真菌，包括厌氧菌、需氧菌、嗜温微生物、嗜热微生物和极端微生物等。

木聚糖酶主要包括3类：① β -1,4-D-内切木聚糖酶(EC3.2.1.8)，从木聚糖主链的内部切割 β -1,4糖苷键，使木聚糖溶液的黏度迅速降低；② β -1,4-D-外切木聚糖酶(EC3.2.1.92)，以单个木糖为切割单位，作用于木聚糖的非还原性末端，使反应体系还原性不断增加；③ β -木糖苷酶(EC3.2.1.37)，切割低聚木糖，水解产物主要为木糖、木二糖及木三糖等低聚木糖。

根据酶的理化特性，木聚糖酶又可分为2大类：即分子量小于30ku的碱性木聚糖酶和分子量大于30ku的酸性木聚糖酶。通常细菌可以同时产生酸、碱性木聚糖酶，但真菌通常只产生低分子量的碱性木聚糖酶。从本质上讲，木聚糖酶都具有外切酶和内切酶活性，只是活性高低不同而已。作为一种工业用酶制剂，木聚糖酶具有潜在的应用价值。首先木聚糖酶可以将农业和木材工业的废物中的木聚糖转化为木糖；其次，Wong等建议木聚糖酶可应用在果汁澄清、咖啡、植物油和淀粉提取加工过程中。

木聚糖酶检测试剂盒(DNS微板法)检测原理是：木聚糖酶能将木聚糖降解成还原性寡糖和单糖，在沸水浴条件下可以与3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂发生显色反应。反应液颜色的深度与酶解产生的还原糖量成正比，而还原糖的生成量又与反应液中木聚糖酶活力成正比。因此，通过测定反应液颜色的强度，可以计算反应液中木聚糖酶的活力。本产品仅用于科研领域，不用于临床诊断或其他用途。

产品组成

名称	编号	ADS083TE0	Storage
		100T	
试剂 A: 木糖标准(10mg/ml)		1ml	4°C
试剂 B: Assay buffer		2 × 100ml	RT
试剂 C: 木聚糖		0.5g	RT
试剂 D: NH ₃ 水溶液(3 ×)		30ml	RT
试剂 E: YS 溶液		5ml	RT
试剂 F: DNS 试剂		10ml	RT 避光
使用说明书		1份	

自备材料

- 1、去离子水或蒸馏水
- 2、电子天平(精度 0.0001g)、pH 计、磁力搅拌器、移液器、小烧杯
- 3、振荡器、纱布、离心机、离心管或试管、三角瓶、容量瓶、
- 4、水浴锅、电热炉、培养箱、酶标仪、酶标板

操作步骤(仅供参考)

- 1、配制木聚糖溶液：准确称取0.15g木聚糖，使充分溶解于8ml去离子和5mlNH₃水溶液(3×)中，通过pH计测定，用YS溶液调节pH至5.5~5.6，补水至15ml，木聚糖终浓度为10mg/ml，4℃避光保存，48小时有效。
- 2、配制NH₃水溶液(1×)：取1份NH₃水溶液(3×)和2份去离子水混合即成。
- 3、标准曲线绘制：取8支离心管按下表设置，准确吸取木糖标准(10mg/ml)与Assay buffer，即得不同浓度的木糖梯度标准。

加入物(ml)	1	2	3	4	5	6	7
木糖标准(10mg/ml)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07
Assay buffer	0.99	0.98	0.97	0.96	0.95	0.94	0.93
木糖标准(mg/ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7

取1支离心管，加入0.08ml Assay buffer和0.1ml DNS试剂，混匀，沸水浴加热5min，自来水冷却至室温，加NH₃水溶液(1×)0.32ml，即为空白管。另取7支离心管，加入0.04ml 37℃预热的Assay buffer、0.04ml木糖梯度标准和0.1ml DNS试剂，混匀，沸水浴加热5min，自来水冷却至室温，加NH₃水溶液(1×)0.32ml，即为标准管。以空白管调零，酶标仪测定540nm处各管的吸光度。

4、准备样品

① 固体样品按照下表中建议的称样量称取试样两份，精确至0.001g。加入4ml Assay buffer，充分溶解，并定容至10ml，在4℃条件下避光保存1~2h。1000g离心3~5min，取上清液，再用Assay buffer做适当稀释、定容(稀释后的酶液中木聚糖酶活力最好能控制在0.04~0.10U/ml之间)。

木聚糖酶活力/(U/g 或者 U/ml)	称量样品/g(或者 ml)
≥2000	0.01~0.02
500~1999	0.02~0.05
200~499	0.05~0.1
50~199	0.1~0.2

10~49

0.2~0.5

②液体样品可以直接用Assay buffer稀释、定容(稀释后的酶液中木聚糖酶活力最好能控制在0.04~0.10U/ml之间)。如果样品稀释后酶液的pH偏离5.4~5.7, 需要用乙酸溶液或氢氧化钠溶液校正至5.4~5.7。

5、测定样品

①取适量的木聚糖溶液和酶提取液置于不同的离心管中, 37°C平衡20min; 木聚糖溶液使用之前应充分摇匀。

②取2支离心管按下表设置依次加入相应试剂:

加入物(ml)	对照管	测定管
酶提取液	0.04	0.04
Assay buffer	0.04	-
木聚糖溶液	-	0.04
37°C水浴 30min		
DNS 试剂	0.1	0.1
立即摇匀, 放入沸水浴中显色5min, 立即取出, 流水冷却至室温, 加NH ₄ 水溶液(1×)0.32ml		

以空白管调零, 酶标仪测定540nm处对照管和测定管的吸光度(分别记为A₁、A₀)。

计算

木聚糖酶活力单位定义: 在37°CpH5.5的条件下, 每分钟从浓度为5mg/ml的木聚糖溶液中降解释放1μmol还原糖所需要的酶量为一个酶活力单位U。根据酶活性定义, 可计算出样品中的木聚糖酶活性。

以系列木糖标准(mg/ml)(1~7号)为横坐标, 以相应的吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。根据标准曲线计算出酶提取液(对照管和测定管)的吸光度相对应的木糖浓度C, 根据下式再计算木聚糖酶活性。

$$D_1 = N \times (C_1 - C_0) \times 1000 / (1 \times M \times t) = N \times (C_1 - C_0) \times 1000 / 4506$$

$$D_2 = D_1 \times V_0 / m$$

式中: D₁——稀释酶液中木聚糖酶的活力, 单位为U/ml

N——样品稀释倍数

C₁——样品测定管木糖浓度, 单位为mg/ml

C₀——样品对照管木糖浓度, 单位为mg/ml

1000——转换因子, 1mmol=1000μmol

M——木糖的摩尔质量，单位为g/mol (=150.2)

t——酶与底物的反应时间，单位为min (=30)

D₂——固体样品中木聚糖酶的活力，单位为U/g

V₀——固体样品的酶提取液总体积，单位为ml

m——称取样品的质量，单位为g

注意事项

- 1、木糖标准应避免反复冻融，以免失效或效率下降。
- 2、木聚糖易溶于碱性溶液中，加入YS溶液后呈悬浊状，静置后可能分层，为减少实验误差，后续实验使用时应摇匀。
- 3、待测酶提取液样品如不能及时测定，应置于-20℃保存，3天内稳定。
- 4、如果样品酶活性过高，应用Assay buffer稀释酶提取液后重测，结果乘以稀释倍数。
- 5、木聚糖酶的最适pH一般在5.5。如果样品稀释后酶液的pH偏离5.4~5.7，需要用乙酸溶液或氢氧化钠溶液校正至5.4~5.7。
- 6、本试剂盒适用于饲料等样品的木聚糖酶活性的测定。
- 7、Assay buffer如不够用，可用乙酸钠缓冲液(0.1mol/L,pH5.5-6.0)替代。
- 8、DNS试剂、NH₃水溶液(2×)和YS溶液有一定的腐蚀性和刺激性，应小心操作。
- 9、沸水浴实验操作时，应当选择带螺旋盖的离心管。
- 10、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：6个月。室温运输，按要求保存。