

酸性木聚糖酶(ACX)检测试剂盒说明书

(货号：ADS-W-TDX075 微板法 96 样)

有效期：3 个月

测定意义：

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中的原料细胞壁以及 β -葡聚糖，降低酿造中物料的粘度，促进有效物质的释放，以及降低饲料中的非淀粉多糖，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中，ACX 一般分离自耐酸的真菌，细菌及部分霉菌。

测定原理：

ACX 在酸性环境下能将木聚糖降解成还原性寡糖和单糖，进一步在沸水浴条件下与 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 ACX 活力。

自备实验用品及仪器：

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。

试剂组成和配制：

缓冲液：液体 100mL \times 2 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂一：液体 20mL \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 避光保存。

试剂二：液体 20mL \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 避光保存。

粗酶提取：

1. 液体样本：直接测定，若浑浊 8000g，4 $^{\circ}$ C，离心 15min，取上清，作为待测样品。
2. 酶干粉：称约 0.1mg，加缓冲液 1mL，震荡溶解待测。
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 $^{\circ}$ C，离心 10min，取上清待测。
4. 细菌或细胞的处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液充分匀浆以破碎并裂解细胞（功率 20%，超声 3S 秒，间隔 10S，重复 30 次）；8000g，4 $^{\circ}$ C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定操作表：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。
- 2、操作表

	对照管	测定管
样品 (μ L)	60	60
缓冲液 (μ L)	90	90
试剂一 (μ L)		60
试剂二 (μ L)	90	
混匀，50 $^{\circ}$ C 水浴中反应 30min，立即沸水浴中 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 (μ L)	60	
试剂二 (μ L)		90
混匀，沸水浴显色 5min(注意不要让盖子爆开，以免进水改变了反应体系)，取 200 μ L 于微量石英比色皿/96 孔板中，540nm 处测定吸光值 A，计算 $\Delta A=A$ 测定管-A 对照管。每个		

测定管设一个对照管。

ACX 计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 2.5554x - 0.002$, $R^2 = 0.9983$

1. 按液体体积活力计算:

酶活定义: 50°C, pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/mL)} &= (\Delta A + 0.002) \div 2.5554 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \\ &= 435 \times (\Delta A + 0.002) \end{aligned}$$

2. 按蛋白浓度计算:

酶活定义: 50°C, pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.002) \div 2.5554 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 435 \times (\Delta A + 0.002) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按鲜重计算:

酶活定义: 50°C, pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.002) \div 2.5554 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W \\ &= 435 \times (\Delta A + 0.002) \div W \end{aligned}$$

4. 按细菌、细胞个数计算

酶活定义: 50°C, pH4.8 条件下, 每 1 万个细菌、细胞每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.002) \div 2.5554 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div 500 \\ &= 0.87 \times (\Delta A + 0.002) \end{aligned}$$

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; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 1.2777x - 0.002$, $R^2 = 0.9983$

1. 按液体体积活力计算:

酶活定义: 50°C, pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/mL)} &= (\Delta A + 0.002) \div 1.2777 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \\ &= 869.6 \times (\Delta A + 0.002) \end{aligned}$$

2. 按蛋白浓度计算:

酶活定义: 50°C, pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.002) \div 1.2777 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 869.6 \times (\Delta A + 0.002) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按鲜重计算:

酶活定义: 50°C, pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A + 0.002) \div 1.2777 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W$$

$$= 869.6 \times (\Delta A + 0.002) \div W$$

4. 按细菌、细胞个数计算

酶活定义：50°C，pH4.8 条件下，每 1 万个细菌、细胞每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量 为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.002) \div 1.2777 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div 500 \\ &= 1.74 \times (\Delta A + 0.002) \end{aligned}$$

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; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

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。
2. 试剂盒 2-8°C 保存, 保质期 3 个月, 建议尽快使用。