

中性木聚糖酶 (Neutral Xylanase, NEX) 测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TDX060 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。

中性木聚糖酶 (NEX) 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 NEX 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 1 瓶	-20°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	4°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、中性木聚糖酶 (NEX) 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:

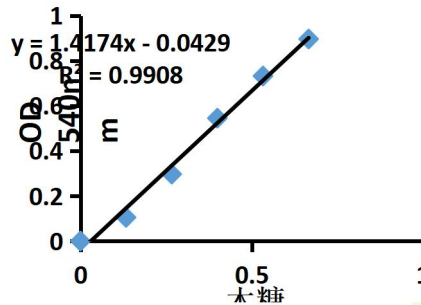
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	100	100
试剂二	100	
40°C孵育60min		
试剂二		100
试剂三	200	200
混匀, 沸水浴 (95-100°C) 5min, 冷却至室温		
蒸馏水	200	200
混匀, 取出全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于		

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 (μmol), y是 ΔA 。



- 2、按蛋白浓度计算:

酶活定义: 40°C, PH6.0 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中性木聚糖酶的活力单位。

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

$$= 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \div \text{Cpr} \times D$$

- 3、按鲜重计算:

酶活定义: 40°C, PH6.0 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中性木聚糖酶的活力单位。

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

$$= 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \div W \times D$$

- 4、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 40°C, PH6.0 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。

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

$$= 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \div 500 \times D$$

- 5、按液体体积计算:

酶活定义: 40°C, PH6.0 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中性木聚糖酶的活力单位。

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

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°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°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。