

## 碱性木聚糖酶 (Basic Xylanase, BAX) 测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX064 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

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) 在碱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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 1 瓶	-20°C避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 12.5mL 试剂一溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	21mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

### 三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

- 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 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。
- ③ 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。

#### 2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 540nm。在 EP 管中依次加入:

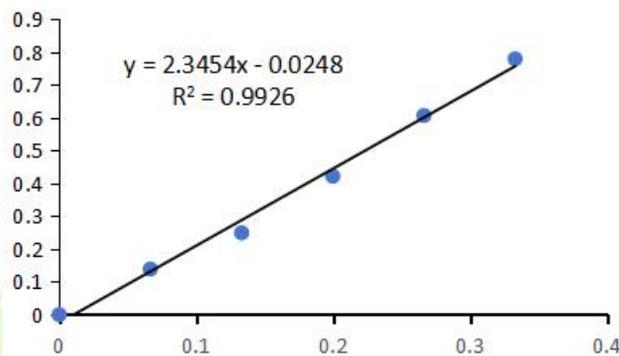
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50

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°C) 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, ΔA=A 测定-A 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:  $y = 2.3454x - 0.0248$ , x 是标准品摩尔质量 (μmol), y 是 ΔA。



2、按鲜重计算:

酶活定义: 40°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。

$$\text{BAX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0248) \div 2.3454 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 142.1 \times (\Delta A + 0.0248) \div W \times D$$

3、按蛋白浓度计算:

酶活定义: 40°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。

$$\text{BAX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0248) \div 2.3454 \times 10^3] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 142.1 \times (\Delta A + 0.0248) \div Cpr \times D$$

4、按液体体积计算:

酶活定义: 40°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。

$$\text{BAX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0248) \div 2.3454 \times 10^3] \div V1 \div T \times D$$

$$= 142.1 \times (\Delta A + 0.0248) \times D$$

5、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 40°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。

$$\text{BAX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0248)\div 2.3454\times 10^3]\div(500\times V1\div V)\div T\times D$$

$$=142.1\times(\Delta A+0.0248)\div 500\times D$$

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 标曲为非必做实验, 用户可根据实验需求制作标曲, 亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算;
- 2 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);
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 200uL, 加入 800uL 蒸馏水, 混匀得到 1 mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	0
试剂一	50	50
蒸馏水	50	100
试剂三	100	100
混匀, 沸水浴 (95-100°C) 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, ΔA=A 标准-A0 浓度。		