酸性木聚糖酶活性检测试剂盒（可见分光光度法）

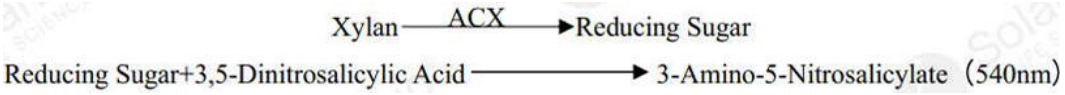
产品货号：BA1278

产品规格：50管/24样

产品简介：

木聚糖酶(EC3.2.1.8)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，酸性木聚糖（ACX）一般分离自耐酸的真菌，细菌及部分霉菌。

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。



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
缓冲液	液体75mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体25mL×1瓶	2-8℃
试剂三	液体8mL×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

溶液的配制：

标准品：10mg木糖。临用前加入667μL蒸馏水配成100μmol/mL的标准品溶液，2-8℃保存8周。

需自备的仪器和用品：

天平、低温离心机、恒温水浴锅，可见分光光度计、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、可调式移液枪、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 发酵液：发酵液于8000rpm，4℃，离心15min，取上清，置冰上作为待测样本。
2. 酶干粉：称1mg，加1mL缓冲液溶解，置冰上待测。
3. 组织样本：称0.1g组织，加入1mL缓冲液，冰上充分研磨。8000rpm，4℃，离心15min，取上清置冰上待测。

注：含还原糖较高的样本(如植物果实等)可用蒸馏水进行适当稀释后再进行测定。

二、测定步骤

1. 可见分光光度预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

扫一扫 加微信
上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com

2. 标准溶液的稀释：临用前按下表将标准品稀释为 3、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625μmol/mL 的标准溶液待测。

序号	稀释前浓度（μmol/mL）	标准品体积（μL）	缓冲液体积（μL）	稀释后浓度（μmol/mL）
1	100	100	900	10
2	10	150	350	3
3	10	100	400	2
4	10	100	900	1
5	1	500	500	0.5
6	0.5	500	500	0.25
7	0.25	500	500	0.125
8	0.125	500	500	0.0625

备注：下述实验中每管需要 200μL(注意不要在此步骤直接检测标准溶液吸光度)。

3. 样本测定：（在 EP 管中加入下列试剂）

试剂名称（μL）	对照管	测定管	空白管	标准管
样本	200	200	-	-
标准品	-	-	-	200
缓冲液	300	300	500	300
试剂一	-	200	200	200
混匀，50℃水浴中反应 30min，立即沸水浴中 10min 灭活。（缠封口膜，防止爆盖）				
试剂一	200	-	-	-
试剂二	300	300	300	300
试剂三	100	100	100	100
混匀，沸水浴中显色 5min（缠封口膜，防止爆盖），冷却后尽快测定各管 540nm 下的吸光度，分别记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准。计算ΔA 测定-A 测定-A 对照，ΔA 标准=A 标准-A 空白。空白管和标准曲线只需做 1-2 次。				

三、ACX 活性计算

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度(x，μmol/mL)和吸光度ΔA 标准(y，ΔA 标准)，建立标准曲线。根据标准曲线，将ΔA 测定(y，ΔA 测定)带入公式计算样本浓度(x，μmol/mL)。

2. 发酵液 ACX 活力计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 条件下每毫升发酵液每分钟分解木聚糖产生 1μmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

ACX 活力（U/mL）= x÷T×F= x÷30×F

3. 酶干粉 ACX 活力计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 条件下每毫克酶干粉每分钟分解木聚糖产生 1μmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

ACX 活力（U/mg）= x×V 样本÷（V 样本×W_1÷V 提取）÷T×F= x÷W_1÷30×F

4. 组织中 ACX 活力计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

扫一扫 加微信
上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com

酶活定义：50℃，pH4.8 条件下每毫克蛋白每分钟分解木聚糖产生 1μmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

ACX 活力（U/mg prot）= x×V 样本÷（V 样本×Cpr）÷T×F= x÷Cpr÷30×F

（2）按样本质量计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 条件下每克组织每分钟分解木聚糖产生 1μmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

ACX 活力（U/g 质量）= x×V 样本÷（V 样本×W_2÷V 提取）÷T×F= x÷W_2÷30×F

V 样本：加入的样本体积，0.2mL；W_1：酶干粉的质量，mg；T：反应时间，30min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W_2：组织样本质量，g；V 提取：加入缓冲液的体积，lmL；F：样本稀释倍数。

注意事项：

吸光度变化应该控制在0.01~1.2之间，否则加大样本量或稀释样本，注意同步修改计算公式中稀释倍数。

实验实例：

1. 取0.1079g蓝莓加入1mL缓冲液进行匀浆研磨，取上清用蒸馏水稀释40倍后按照测定步骤操作，用96孔板测得ΔA测定=A测定-A对照=0.717-0.581=0.136，带入标曲y=0.413x-0.0233 (R^2=0.9993)，计算x=0.386，按质量计算ACX活性得：

   ACX活力（U/g 质量)=x÷W÷30×F=0.386÷0.1079÷30×40=4.770U/g 质量。

2. 取泡菜汁离心取上清按照测定步骤操作，用96孔板测得ΔA测定=A测定-A对照=0.639-0.392=0.247，带入标曲y=0.413x-0.0233 (R^2=0.9993)，计算x=0.654，按发酵液计算ACX活力得：

   ACX 活力（U/mL）= x÷T×F =0.654÷30×1=0.022U/mL。

扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com