

半纤维素酶/木聚糖酶测定试剂盒说明书

(货号: BP10236W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

半纤维素酶主要检测木聚糖酶活力, 可将木聚糖降解成低聚糖和木糖的一组酶的总称, 广泛应用于酿造和饲料工业中。

半纤维素酶在酸性下将木聚糖降解成还原性寡糖和单糖, 进一步与 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, 即可计算该酶活力大小。

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℃避光保存	
试剂一	25mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉体 1 瓶	-20℃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℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃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、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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃, 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℃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。

② 在 EP 管中依次加入：

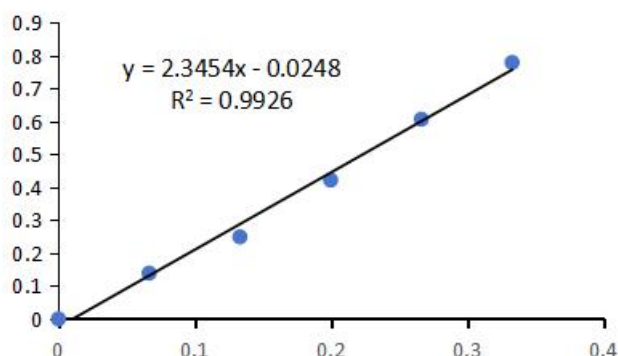
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一	50	50
试剂二	50	
40°C 孵育 60min		
试剂二		50
试剂三	100	100
混匀，沸水浴（95-100°C）5min，冷却至室温		
蒸馏水	100	100
混匀，取出 200μL 待检液至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管设一个对照管）。		

【注】1. 若 A 值大于 1.5，最后一步检测时可进行稀释：如取 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、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克样本每分钟分解木聚糖产生 1nmol 木糖所需酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0248) \div 2.3454 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 142.1 \times (\Delta A + 0.0248) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟分解木聚糖产生 1nmol 木糖所需酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0248) \div 2.3454 \times 10^3] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 142.1 \times (\Delta A + 0.0248) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体样本每分钟分解木糖产生 1nmol 木糖所需酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0248) \div 2.3454 \times 10^3] \div V1 \div T \times D \\ &= 142.1 \times (\Delta A + 0.0248) \times D \end{aligned}$$

5、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟分解木聚糖产生 1nmol 木糖所需酶量为一个酶活力单位。

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

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

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℃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℃）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， △A=A标准-A0浓度。		