

中性木聚糖酶（Neutral Xylanase, NEX）测定试剂盒说明书

（货号：BP10264F 分光法 48 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。

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	60mL 液体×1 瓶	4℃保存	
试剂一	25mL×1 瓶	4℃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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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℃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：

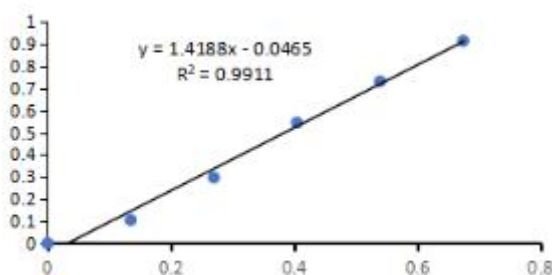
- ① 分光光度计预热 30min（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 540nm，蒸馏水调零。在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (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, 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 350μL 待检液至比色皿中, 再加 350μL 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 200μL, 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: $y = 1.4188x - 0.0465$, 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, 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。

$$\text{NEX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0465) \div 1.4188 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 117.47 \times (\Delta A + 0.0465) \div W \times D$$

- 3、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。

$$\text{NEX 活力 (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0465) \div 1.4188 \times 10^3] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 117.47 \times (\Delta A + 0.0465) \div Cpr \times D$$

- 4、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。

$$\text{NEX 活力 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0465) \div 1.4188 \times 10^3] \div V1 \div T \times D = 117.47 \times (\Delta A + 0.0465) \times D$$

- 5、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。

$$\text{NEX 活力 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0465) \div 1.4188 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 0.235 \times (\Delta A + 0.0465) \times D$$

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 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	100	0
试剂一	100	100
蒸馏水	100	200
试剂三	200	200
混匀, 沸水浴 (95-100℃) 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, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{0 浓度}}$ 。		