

中性木聚糖酶（Neutral Xylanase, NEX）测定试剂盒说明书

（货号：BP10264W 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。

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	100mL 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）、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℃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。在 EP 管中依次加入：

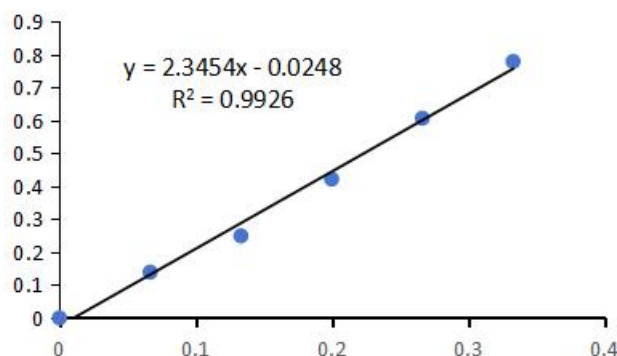
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一	50	50
试剂二	50	
40℃孵育60min		
试剂二		50
试剂三	100	100
混匀，沸水浴（95-100℃）5min，冷却至室温		
蒸馏水	100	100
混匀，取出200μL待检液至96孔板中，于540nm处读取吸光值A，ΔA=A测定-A对照（每个测定管设一个对照管）。		

【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℃，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。

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

3、按蛋白浓度计算：

酶活定义：40℃，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。

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

4、按液体体积计算：

酶活定义：40℃，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。

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

5、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：40℃，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。

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

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

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。		