

半纤维素酶/木聚糖酶测定试剂盒说明书

(货号: G0709F 分光法 48 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
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 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 12.5mL 试剂一溶解备用。
试剂三	21mL×1 瓶	-20℃ 保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、恒温水浴锅、可调式移液器。

四、半纤维素酶活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织: 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 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。

③ 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。

2、上机检测:

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

② 在 EP 管中依次加入:

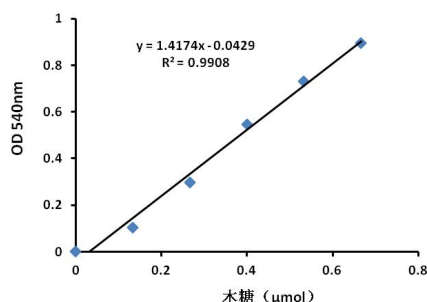
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	100	100
试剂二	100	
40℃ 孵育 60min		
试剂二		100
试剂三	200	200
混匀, 沸水浴 (95-100℃) 5min, 冷却至室温		
蒸馏水	200	200

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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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 350 μ L 待检液至比色皿中, 再加 350 μ L 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 200 μ L, 则试剂一减少为 0 μ L), 则改变后的 V1 代入公式计算。

五、结果计算:

- 1、标准曲线方程: $y = 1.4174x - 0.0429$, x 是标准品摩尔质量 (μ mol), y 是 ΔA 。



- 2、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单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0429) \div 1.4174 \times 10^3] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

- 3、按样本重量计算:

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单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0429) \div 1.4174 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \div W \times D \end{aligned}$$

- 4、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单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0429) \div 1.4174 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.235 \times (\Delta A + 0.0429) \div W \times D \end{aligned}$$

- 5、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单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0429) \div 1.4174 \times 10^3] \div V1 \div T \times D \\ &= 117.6 \times (\Delta A + 0.0429) \times D \end{aligned}$$

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; 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 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 $^{\circ}$ C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。
- 3 100 μ L 标准品+100 μ L 试剂一+100 μ L 蒸馏水+200 μ L 试剂三, 混匀, 沸水浴(95-100 $^{\circ}$ C) 5min, 冷却至室温, 再加 200 μ L 蒸馏水, 混匀后取出全部液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 540nm 处读取吸光值 A。根据结果即可制作标准曲线。