

半纤维素酶/木聚糖酶测定试剂盒说明书

(货号: G0709W 微板法 96 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	100mL 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:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、恒温水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

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、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 酶标仪预热 30min, 调节波长至 540nm。
- ② 在 EP 管中依次加入:

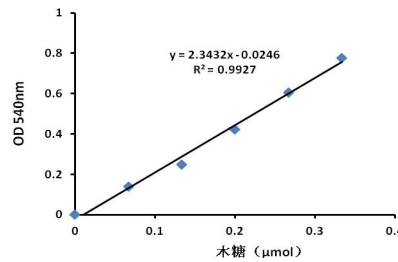
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一	50	50
试剂二	50	
40℃ 孵育 60min		
试剂二		50
试剂三	100	100

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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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： $y = 2.3432x - 0.0246$ ，x 是标准品摩尔质量（μmol），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力单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0246) \div 2.3432 \times 10^3] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 142.3 \times (\Delta A + 0.0246) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

- 3、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。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0246) \div 2.3432 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 142.3 \times (\Delta A + 0.0246) \div W \times D \end{aligned}$$

- 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力单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0246) \div 2.3432 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.285 \times (\Delta A + 0.0246) \div W \times D \end{aligned}$$

- 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力单位。

$$\begin{aligned} \text{半纤维素酶活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0282) \div 1.0584 \times 10^3] \div V1 \div T \times D \\ &= 157.5 \times (\Delta A + 0.0282) \times D \end{aligned}$$

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； 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℃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 50μL 标准品+50μL 试剂一+50μL 蒸馏水+100μL 试剂三，混匀，沸水浴（95-100℃）5min，冷却至室温，再加 100μL 蒸馏水，混匀后取出 200μL 液体至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A。根据结果即可制作标准曲线。