

酸性木聚糖酶（ACX）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2605

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
缓冲液	液体 90 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 8mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 12 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

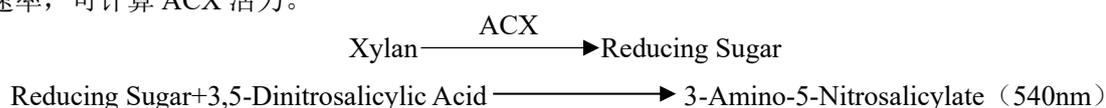
溶液的配制：

- 1、标准品：10mg 木糖。临用前加入 667 μ L 缓冲液配成 100 μ mol/mL 的标准品溶液，2-8°C保存 8 周。

产品说明：

木聚糖酶(EC 3.2.1.8)主要由微生物产生，能催化水解木聚糖，也被称为戊聚糖酶或半纤维素酶，可分解酿造或饲料工业中的原料细胞壁以及 β -葡聚糖，降低酿造中物料的粘度，促进有效物质的释放，以及降低饲料中的非淀粉多糖，促进营养物质的吸收利用，因而广泛的应用于酿造和饲料工业中，酸性木聚糖酶（ACX）一般分离自耐酸的真菌，细菌及部分霉菌。

ACX 在酸性环境下能将木聚糖降解成还原性寡糖和单糖，进一步在沸水浴条件下与 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 ACX 活力。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

天平、低温离心机、恒温水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液枪、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 发酵液：发酵液于 8000rpm，4°C，离心 15min，取上清，置冰上作为待测样本。
2. 酶干粉：称 1mg，加 1mL 缓冲液溶解，置冰上待测。
3. 组织样本：称 0.1g 组织，加入 1mL 缓冲液，冰上充分研磨。8000rpm，4°C，离心 15min，取上清置冰上待测。

注：含还原糖较高的样本（如植物果实等）可用蒸馏水进行适当稀释后再进行测定。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热30min 以上，调节波长至540nm，可见分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准溶液的稀释：临用前按下表将标准品稀释为5、4、3、2、1、0.5、0.25 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液待测。

序号	稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	标准品体积 (μL)	缓冲液体积 (μL)	稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
1	100	100	900	10
2	10	100	100	5
3	10	80	120	4
4	10	60	140	3
5	10	40	160	2
6	10	40	360	1
7	1	100	100	0.5
8	0.5	100	100	0.25

备注：实验中每管需要60 μL 。

- 3、样本测定：（在EP管中加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	空白管	标准管
样本	60	60	-	-
标准品	-	-	-	60
缓冲液	90	90	150	90
试剂一	-	60	60	60
混匀，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应30min，立即沸水浴中10min灭活。（注意不要让盖子爆开，以免进水，改变反应体系）				
试剂一	60	-	-	-
试剂二	90	90	90	90
试剂三	30	30	30	30
混匀，沸水浴中显色5min（注意不要让盖子爆开，以免进水改变了反应体系），冷却后吸取200 μL 至96孔板或比色皿中，尽快测定各管540nm下的吸光度，分别记为A测定、A对照、A空白、A标准，计算 $\Delta\text{A测定}=\text{A测定}-\text{A对照}$ ， $\Delta\text{A标准}=\text{A标准}-\text{A空白}$ 。空白管和标准曲线只需做1-2次。				

三、ACX活性计算

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）和吸光度 $\Delta\text{A标准}$ （y， $\Delta\text{A标准}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta\text{A测定}$ （y， $\Delta\text{A测定}$ ）带入公式计算样本浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）。

2. 发酵液 ACX 活力计算：

酶活定义：50 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 4.8 条件下每毫升发酵液每分钟分解木聚糖产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (U/mL)} = x \div T \times F = x \div 30 \times F$$

3. 酶干粉 ACX 活力计算：

酶活定义：50°C，pH 4.8 条件下每毫克酶干粉每分钟分解木聚糖产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (U/mg)} = x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times W_1 \div V_{\text{提取}}) \div T \times F = x \div W_1 \div 30 \times F$$

4. 组织中 ACX 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

酶活定义：50°C，pH 4.8 条件下每毫克蛋白每分钟分解木聚糖产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F = x \div C_{\text{pr}} \div 30 \times F$$

(2) 按样本质量计算:

酶活定义：50°C，pH 4.8 条件下每克样本每分钟分解木聚糖产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{ACX 活力 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times W_2 \div V_{\text{提取}}) \div T \times F = x \div W_2 \div 30 \times F$$

V 样本：加入的样本体积，0.06mL；W₁：酶干粉的质量，mg；T：反应时间，30min；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；W₂：组织样本质量，g；V 提取：加入缓冲液的体积，1mL；F：样本稀释倍数。

注意事项:

吸光度变化应该控制在 0.01~1.3 之间，否则加大样本量或稀释样本，注意同步修改计算公式中的稀释倍数。

实验实例:

1、取 0.1079g 蓝莓加入 1mL 缓冲液进行匀浆研磨，取上清用蒸馏水稀释 20 倍后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得 ΔA 测定=A 测定- A 对照=0.933-0.795=0.138，带入标曲 $y=0.2652x-0.0355$ ($R^2=0.9992$)，计算 $x=0.654$ ，按样本质量计算 ACX 活性得：

$$\text{ACX 活力 (U/g 质量)} = x \div W \div 30 \times F = 0.654 \div 0.1079 \div 30 \times 20 = 4.041 \text{ U/g 质量。}$$

2、取泡菜汁离心取上清按照测定步骤操作，用 96 孔板测得 ΔA 测定=A 测定- A 对照=0.354-0.245=0.109，带入标曲 $y=0.2652x-0.0355$ ($R^2=0.9992$)，计算 $x=0.545$ ，按发酵液计算 ACX 活力得：

$$\text{ACX 活力 (U/mL)} = x \div T \times F = 0.545 \div 30 \times 1 = 0.018 \text{ U/mL。}$$

相关系列产品:

BC2590/BC2595 中性木聚糖酶 (NEX) 活性检测试剂盒

BC3610/BC3615 碱性木聚糖酶 (BAX) 活性检测试剂盒