

## 中性木聚糖酶（NEX）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：BC2595

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 70 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂一  | 液体 7 mL×1 瓶  | 2-8℃保存 |
| 试剂二  | 液体 10 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 标准品  | 粉剂×1 支       | 2-8℃保存 |

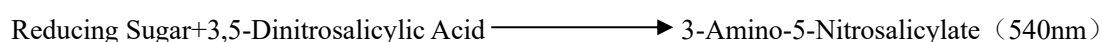
溶液的配制：

标准品：10mg 木糖。临用前加入 667μL 蒸馏水配成 100μmol/mL 的标准品溶液，2-8℃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，中性木聚糖酶（NEX）一般分离自最适生长 pH 为 6-8 的微生物。

NEX 在中性环境中催化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 NEX 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：**

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

**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、细胞或微生物样本发酵液的制备：发酵液于 8000rpm，4℃，离心 15min，取上清，置于冰上待测。
- 2、组织：称取 0.1g 组织，加入 1mL 缓冲液，冰上充分研磨。8000g，4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。
- 3、酶干粉：称 1mg，加缓冲液 1mL，震荡充分溶解后置冰上待测。

**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：临用前用蒸馏水将标准品稀释为6、5、4、3、2、1 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液待测。
- 3、标准品：

| 序号 | 稀释前浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ ) | 标准品体积 ( $\mu\text{L}$ ) | 蒸馏水体积 ( $\mu\text{L}$ ) | 稀释后浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ ) |
|----|------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|
| 1  | 100                          | 100                     | 900                     | 10                           |
| 2  | 10                           | 120                     | 80                      | 6                            |
| 3  | 10                           | 100                     | 100                     | 5                            |
| 4  | 10                           | 80                      | 120                     | 4                            |
| 5  | 10                           | 60                      | 140                     | 3                            |
| 6  | 10                           | 40                      | 160                     | 2                            |
| 7  | 10                           | 40                      | 360                     | 1                            |

备注：实验中每管需要50 $\mu\text{L}$ 。

- 4、样本测定：

| 加入试剂  | 对照管 | 测定管 | 标准管 | 空白管 |
|---|-----|-----|-----|-----|
| 样本 ( $\mu\text{L}$ )  | 50  | 50  | -   | -   |
| 标准品 ( $\mu\text{L}$ )   | -   | -   | 50  | -   |
| 蒸馏水 ( $\mu\text{L}$ )   | -   | -   | -   | 50  |
| 缓冲液 ( $\mu\text{L}$ )   | 75  | 75  | 75  | 75  |
| 试剂一 ( $\mu\text{L}$ )   | -   | 50  | 50  | 50  |
| 混匀，盖紧瓶盖，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴，反应30min，立即沸水浴10min灭活。（注意不要让盖子爆开，以免进水，改变了反应体系）  |     |     |     |     |
| 试剂一 ( $\mu\text{L}$ )   | 50  | -   | -   | -   |
| 试剂二 ( $\mu\text{L}$ )   | 75  | 75  | 75  | 75  |
| 混匀，沸水浴显色5min（注意不要让盖子爆开，以免进水改变了反应体系），冰浴冷却后吸取200 $\mu\text{L}$ 至96孔板/比色皿中，尽快测量540nm波长下的吸光值A对照、A测定、A标准、A空白，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。空白管和标准管只需做1-2次。 |     |     |     |     |

### 三、NEX计算公式

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

2. 发酵液 NEX 活力计算：

酶活定义：50 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 6.0 条件下每毫升发酵液每分钟分解木聚糖产生 1 $\mu\text{mol}$  还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

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

3. 酶干粉 NEX 活力计算：

酶活定义：50 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 6.0 条件下，每毫克酶每分钟分解木聚糖产生 1 $\mu\text{mol}$  还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

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

#### 4. 组织中 NEX 活力的计算:

##### (1) 按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 50°C, pH 6.0 条件下, 每 mg 组织蛋白每分钟分解木聚糖产生 1 $\mu$ mol 还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

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

##### (2) 按样本质量计算:

酶活定义: 50°C, pH 6.0 条件下, 每 g 组织每分钟分解木聚糖产生 1 $\mu$ mol 还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

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

V 样本: 加入的样本体积, 0.05mL; W 酶: 酶干粉的质量, mg; T: 反应时间, 30min; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 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 0.01~1.5 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 0.1090g 橙子加入 1mL 缓冲液进行匀浆研磨, 取上清用蒸馏水稀释 10 倍后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.802 - 0.739 = 0.063$ , 带入标曲  $y = 0.1859x - 0.1003$  ( $R^2 = 9968$ ), 计算  $x = 0.8784$ , 按样本质量计算 NEX 活性得:

$$\text{NEX 活力 (U/g 质量)} = x \div W \div 30 \times F = 0.8784 \div 0.1090 \div 30 \times 10 = 2.6862 \text{ U/g 质量。}$$

2、取泡菜汁离心取上清按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.782 - 0.167 = 0.615$ , 带入标曲  $y = 0.1859x - 0.1003$  ( $R^2 = 9968$ ), 计算  $x = 3.848$ , 按发酵液计算 NEX 活力得:

$$\text{NEX 活力 (U/mL)} = x \div T \times F = 3.848 \div 30 \times 1 = 0.1283 \text{ U/mL。}$$

#### 相关系列产品:

BC2600/BC2605 酸性木聚糖酶 (ACX) 活性检测试剂盒

BC3610/BC3615 碱性木聚糖酶 (BAX) 活性检测试剂盒