

碱性木聚糖酶 (Basic Xylanase, BAX) 测定试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

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碱的原料细胞壁以及 β -葡聚糖,降低酿造碱物料的粘度,促进有效物质的释放,以及降低饲料碱的非淀粉多糖,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碱,BAX 一般分离自最适生长 pH 为 9-11 的微生物。

测定原理:

BAX 在碱性环境碱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 BAX 活力。

组成:

产品名称	GMS055-100T/48S	Storage
缓冲液: 液体	65ml	4°C
试剂一: 液体	10ml	4°C避光
试剂二: 液体	10ml	4°C避光
说明书	一份	

试剂一: 液体 10ml \times 1 瓶, 4°C避光保存。(若出现白色絮状或颗粒状沉淀,可 60°C加热溶解后使用)。

自备仪器和用品:

天平、低温离心机、恒温水浴锅,可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

粗酶提取:

1. 发酵液: 发酵液于 8000g, 4°C, 离心 15min, 取上清, 作为待测样品。
2. 酶干粉: 称约 0.1mg, 加 1ml 缓冲液溶解待测。
3. 组织样本: 按照组织质量 (g) : 提取液体积(ml)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1ml 缓冲液) 进行冰浴匀浆, 然后 8000g, 4°C, 离心 10min, 取上清待测。

测定操作表:

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 540nm。



2、操作表

	对照管	测定管
样品 (μl)	60	60
缓冲液 (μl)	90	90
试剂一 (μl)		60
试剂二 (μl)	90	
混匀, 盖紧瓶盖, 50°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 (μl)	60	
试剂二 (μl)		90
混匀, 沸水浴显色 5min, 取 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板中 540nm 处测定吸光值 A, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个对照管。		

BAX 计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 2.8432x - 0.0293$, $R^2 = 0.9985$

1. 按液体体积活力计算:

酶活定义: 50°C, pH9.0 条件下, 每毫升液体样本每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/ml)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \end{aligned}$$

2. 按蛋白浓度计算:

酶活定义: 50°C, pH9.0 条件下, 每毫克蛋白每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按鲜重计算:

酶活定义: 50°C, pH9.0 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碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \div W \end{aligned}$$

150: 木糖的分子量; T: 反应时间, 30min; 稀释倍数 = $V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 300\mu\text{L} \div 60\mu\text{L} = 5$;

10^6 : 转化因子, 即 $1\text{mg/ml} = 10^6\text{ng/ml}$; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/ml; W: 样本质量, g。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 1.4216x - 0.0293$, $R^2 = 0.9985$

1. 按液体体积活力计算:

酶活定义: 50°C, pH9.0 条件下, 每毫升液体样本每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{BAX 活力 (nmol/min/ml)} = (\Delta A + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6$$

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



$$= 782 \times (\Delta A + 0.0293)$$

2. 按蛋白浓度计算:

酶活定义: 50°C, pH9.0 条件下, 每毫克蛋白每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 782 \times (\Delta A + 0.0293) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按鲜重计算:

酶活定义: 50°C, pH9.0 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碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W \\ &= 782 \times (\Delta A + 0.0293) \div W \end{aligned}$$

150: 木糖的分子量; T: 反应时间, 30min; 稀释倍数=V 反总÷V 样=300μL÷60μL=5;

10⁶: 转化因子, 即 1mg/ml=10⁶ng/ml; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/ml; W: 样本质量, g。

注意事项:

1. 吸光度变化应该控制在 0.01 ~ 0.8 之间, 否则加大样品量或稀释样品, 注意计算公式中参与计算的稀释倍数要相应改变; 也可以延长或者缩短反应时间。
2. 试剂盒 2+8°C 保存, 保质期 3 个月, 建议尽快使用。

