

## 酸性木聚糖酶 (Acidic Xylanase, ACX) 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中的原料细胞壁以及 $\beta$ -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,ACX 一般分离自耐酸的真菌,细菌及部分霉菌。

### 测定原理:

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。

### 组成:

| 产品名称    | GMS057-100T/48S | Storage |
|---------|-----------------|---------|
| 缓冲液: 液体 | 90ml            | 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。

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



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线: 0518-81263339

官网:<http://www.bio149.com>

## 2、操作表

|   | 对照管 | 测定管 |
|---|-----|-----|
| 样品 (μl)   |     | 60  |
| 灭活的样品 (μl)<br>(95°C水浴 15min)  | 60  |     |
| 缓冲液 (μl)  | 90  | 90  |
| 试剂一 (μl)  | 60  | 60  |
| 混匀, 50°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, 改变了反应体系)   |     |     |
| 试剂二 (μl)  | 90  | 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。 |     |     |

### ACX 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:  $y = 2.5554x - 0.002$ ,  $R^2 = 0.9983$

##### 1. 按液体体积活力计算:

酶活定义: 50°C, pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/ml)} &= (\Delta A + 0.002) \div 2.5554 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \\ &= 435 \times (\Delta A + 0.002) \end{aligned}$$

##### 2. 按蛋白浓度计算:

酶活定义: 50°C, pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.002) \div 2.5554 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 435 \times (\Delta A + 0.002) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

##### 3. 按鲜重计算:

酶活定义: 50°C, pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.002) \div 2.5554 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W \\ &= 435 \times (\Delta A + 0.002) \div W \end{aligned}$$

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

$10^6$ : 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:  $y = 1.2777x - 0.002$ ,  $R^2 = 0.9983$

##### 1. 按液体体积活力计算:

酶活定义: 50°C, pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/ml)} &= (\Delta A + 0.002) \div 1.2777 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \\ &= 869.6 \times (\Delta A + 0.002) \end{aligned}$$

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



2. 按蛋白浓度计算:

酶活定义: 50°C, pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.002) \div 1.2777 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 869.6 \times (\Delta A + 0.002) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按鲜重计算:

酶活定义: 50°C, pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.002) \div 1.2777 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W \\ &= 869.6 \times (\Delta A + 0.002) \div W \end{aligned}$$

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;

10<sup>6</sup>: 转化因子, 即 1mg/ml=10<sup>6</sup>ng/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。
2. 试剂盒 2-8°C 保存, 保质期 3 个月, 建议尽快使用。

