



## 中性木聚糖酶（NEX）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

**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：BC2590

规格：50T/24S

**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 50 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 25 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

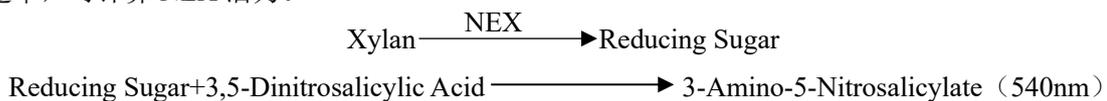
溶液的配制：

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°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，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、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、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°C，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°C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、可见分光光度计预热30min 以上，调节波长至540nm，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5、4、3、2、1 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液待测。

3、准品稀释表：

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	150	1350	10
2	10	200	200	5
3	10	200	300	4
4	10	150	350	3
5	10	100	400	2
6	10	100	900	1

备注：实验中每管需要200 $\mu\text{L}$ 。

4、样本测定：

加入试剂	对照管	测定管	标准管	空白管
样本 ( $\mu\text{L}$ )	200	200	-	-
标准品 ( $\mu\text{L}$ )	-	-	200	-
蒸馏水 ( $\mu\text{L}$ )	-	-	-	200
缓冲液 ( $\mu\text{L}$ )	300	300	300	300
试剂一 ( $\mu\text{L}$ )	-	200	200	200
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 ( $\mu\text{L}$ )	200	-	-	-
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )	300	300	300	300
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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。空白管和标准曲线只需做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。

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

(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, 0.2mL; 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: 前处理中加入的缓冲液体积, 1mL; F: 样本稀释倍数。

**注意事项:**

吸光度变化应该控制在 0.01~1.2 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 0.1193g 蓝莓加入 1mL 缓冲液进行匀浆研磨, 取上清用蒸馏水稀释 40 倍后按照测定步骤操作, 用比色皿测得  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.497 - 0.458 = 0.039$ , 带入标曲  $y = 0.32x - 0.1474$  ( $R^2 = 0.9982$ ), 计算  $x = 0.5825$ , 按样本质量计算 NEX 活性得:

$$\text{NEX 活力 (U/g 质量)} = x \div W \div 30 \times F = 0.5825 \div 0.1193 \div 30 \times 40 = 6.510 \text{ U/g 质量。}$$

2、取泡菜汁离心取上清用蒸馏水稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 用比色皿测得  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.474 - 0.081 = 0.393$ , 带入标曲  $y = 0.32x - 0.1474$  ( $R^2 = 0.9982$ ), 计算  $x = 1.689$ , 按发酵液计算 NEX 活力得:

$$\text{BAX 活力 (U/mL)} = x \div T \times F = 1.689 \div 30 \times 2 = 0.113 \text{ U/mL。}$$

**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