

碱性木聚糖酶（BAX）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：BC3615

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 8 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

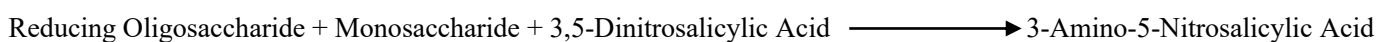
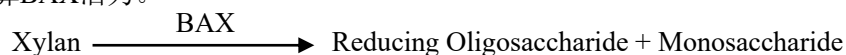
溶液的配制：

- 1、标准品：10mg 木糖。临用前加入 667μL 蒸馏水配制成 100μmol/mL 的木糖标准液，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，碱性木聚糖酶（BAX）一般分离自最适生长pH为9-11的微生物。

BAX在碱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BAX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：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、天平、低温离心机、水浴锅、研钵/匀浆器、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℃，离心 15min，取上清，置冰上作为待测样本。
- 2、组织样本：称 0.1g 组织，加入 1mL 缓冲液，冰上充分研磨。4℃，8000rpm 离心 15min，取上清置冰上待测。
- 3、酶干粉：称 1mg，加 1mL 缓冲液溶解后置冰上待测。

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，分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、标准溶液的稀释：临用前按下表将标准品稀释为6、5、4、3、2、1 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液待测。

序号	稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	标准品体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	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
蒸馏水	-	-	60	-
缓冲液	90	90	90	90
试剂一	-	60	60	60
涡旋混匀，置于50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中反应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)				
试剂一	60	-	-	-
试剂二	90	90	90	90
涡旋混匀，沸水浴中准确显色 5min(注意不要让盖子爆开，以免进水改变了反应体系)，冷却至室温后，吸取 200 μL 于 96 孔板或微量玻璃比色皿中，尽快测定各管 540nm 下的吸光度，分别记为 A 对照、A 测定、A 空白、A 标准。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测 1-2 次。每个测定管需设一个对照管。				

三、BAX 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BAX活力计算：

酶活定义：50 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 9.0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碱性木聚糖酶的活力单位。

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

T：反应时间，30min；F：稀释倍数。

3. 酶干粉BAX活力计算：

酶活定义：50 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 9.0条件下，每毫克酶每分钟分解木聚糖产生1 μmol 还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

BAX活力 (U/mg 质量) = $x \times V_{\text{提取}} \div W1 \div T \times F = x \div W1 \div 30 \times F$

V提取: 加入缓冲液体积, 1mL; W1: 酶干粉重量, mg; T: 反应时间, 30min; F: 稀释倍数。

4. 组织中BAX活力计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 50°C, pH 9.0条件下, 每mg组织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碱性木聚糖酶的活力单位。

BAX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 9.0条件下, 每克组织每分钟分解木聚糖产生1 μ mol还原糖所需的酶量为一个碱性木聚糖酶的活力单位。

BAX活力 (U/g 质量) = $x \times V_{\text{提取}} \div W2 \div T \times F = x \div W2 \div 30 \times F$

V提取: 加入缓冲液体积, 1mL; W2: 样本质量, g; T: 反应时间, 30min; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; V样本: 加入的样本体积, 0.06mL; F: 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 0.1179g 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 1.194 - 1.040 = 0.154$, 带入标曲 $y = 0.2017x - 0.1171$ ($R^2 = 0.999$), 计算 $x = 1.344$, 按样本质量计算 BAX 活性得:

BAX 活力 (U/g 质量) = $x \div W2 \div 30 \times F = 1.344 \div 0.1179 \div 30 \times 10 = 3.80$ 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.925 - 0.169 = 0.756$, 带入标曲 $y = 0.2017x - 0.1171$ ($R^2 = 0.999$), 计算 $x = 4.329$, 按发酵液计算 BAX 活力得:

BAX 活力 (U/mL) = $x \div T \times F = 4.329 \div 30 \times 1 = 0.144$ U/mL。

相关系列产品:

BC2600/BC2605 酸性木聚糖酶 (ACX) 活性检测试剂盒

BC2590/BC2595 中性木聚糖酶 (NEX) 活性检测试剂盒

BC2620/BC2625 β -木糖苷酶活性检测试剂盒