

碱性木聚糖酶 (BAX) 活性检测试剂盒说明书

Alkaline Xylanase Assay Kit

微量法

货号: AK118

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK118-提取液 ES18	65ml×1 瓶	4℃保存
AK118-A	10ml×1 瓶	4℃避光保存
AK118-B	10ml×1 瓶	4℃避光保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 碱性木聚糖酶 (Alkaline Xylanase, BAX) (EC 3.2.1.8) 是在碱性条件下具有较高酶活的木聚糖酶, 其活性成分就是木聚糖酶。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, BAX 一般分离自最适生长 pH 为 9-11 的微生物。

原理: 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。

自备用品:

天平、低温离心机、恒温水浴锅, 可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 发酵液: 发酵液于 8000g, 4℃, 离心 15min, 取上清, 作为待测样品。
2. 酶干粉: 称约 0.1mg, 加缓冲液 1mL, 震荡溶解待测。

检测步骤:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 540 nm, 蒸馏水调零。
2. 在 EP 管中按顺序加入下列试剂:

	对照管 (ul)	测定管 (ul)
样品	60	60
缓冲液 ES18	90	90
AK118-A		60
AK118-B	90	
混匀, 盖紧瓶盖, 50℃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)		
AK118-A	60	
AK118-B		90
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), 取 200 μ L 于微量石英比色皿/96 孔板中, 对照管调零, 测定 A540。		

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. 发酵液 BAX 活力计算:

酶活定义: 50℃, pH9.0 条件下, 每毫升发酵液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。

$$\text{BAX 活力 (nmol/min /mL)} = 5 \times 1000 \times (A_{540} + 0.0293) \div 2.8432 \times 150 \times 30 = 391 \times (A_{540} + 0.0293)$$

注: 150: 木糖的分子量, 30: 反应时间, 5: 稀释倍数 (300μL÷60μL=5), 1000: 转化因子, 即 1mmol/L=1000umol/L

2. 酶干粉 BAX 活力计算:

酶活定义: 50℃, pH9.0 条件下, 每毫克酶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。

$$\text{BAX 活力 (nmol/min /mL)} = 5 \times 1000 \times (A_{540} + 0.0293) \div 2.8432 \times 150 \times 30 \times W = 391 \times (A_{540} + 0.0293) \div W$$

注: 150: 木糖的分子量, 30: 反应时间, 5: 稀释倍数 (300uL÷60uL=5), 1000: 转化因子, 即 1mmol/L=1000umol/L; W: 样品质量: mg。

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. 发酵液 BAX 活力计算

酶活定义: 50℃, pH9.0 条件下, 每毫升发酵液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。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min /mL)} &= (A_{540} + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 1000 \\ &= 782 \times (A_{540} + 0.0293) \end{aligned}$$

2. 酶干粉 BAX 活力计算

酶活定义: 50℃, pH9.0 条件下, 每毫克酶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。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min /mg)} &= (A_{540} + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 1000 \div W \\ &= 782 \times (A_{540} + 0.0293) \div W \end{aligned}$$

注: 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; 1000: 转化因子, 即 1mmol/L=1000μ mol/L ; W: 样品质量: mg。

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℃保存, 保质期 3 个月, 建议尽快使用。