

中性木聚糖酶（Neutral Xylanase, NEX）测定试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

木聚糖酶在自然界分布广泛，可从动物、植物和微生物中获得。可将木聚糖降解成低聚糖和木糖的一组酶的总称，也被称为戊聚糖酶或半纤维素酶，广泛应用于酿造和饲料工业中。

中性木聚糖酶（NEX）在中性环境中水解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 3,5-二硝基水杨中发生显色反应，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。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	125mL 液体×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 25mL 的提取液溶解备用。
试剂二	50mL×1 瓶	-20℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、恒温水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、中性木聚糖酶（NEX）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

- ① 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取

- ② 细菌/培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500：1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本：澄清液体直接检测；若浑浊则 12000rpm，4℃，离心 15min，取上清待测。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min，调节波长至 540nm。

- ② 在 EP 管中依次加入：

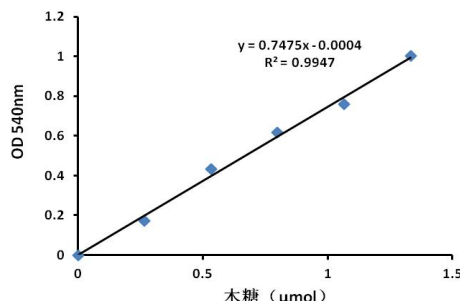
试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	100	
试剂二		250
40℃孵育 60min		
试剂一		100
试剂二	250	
混匀，沸水浴（95-100℃）5min，冷却至室温		
蒸馏水	800	800
混匀，取出 200 μ L 待检液至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸		

光值A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定管设一个对照管)。

【注】若A值大于1.5, 最后一步检测时可进行稀释: 如取100 μL 待检液至96孔板中, 再加100 μL 蒸馏水, 相当于稀释倍数D为2, 需带入计算公式参与计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.7475x - 0.0004$, x是标准品摩尔质量(μmol), y是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算:

酶活定义: 40 $^{\circ}\text{C}$, PH6.0 条件下, 每毫克蛋白每分钟分解木聚糖产生 1nmol 木糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NEX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0004) \div 0.7475 \times 10^3] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 223 \times (\Delta A + 0.0004) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

3、按鲜重计算:

酶活定义: 40 $^{\circ}\text{C}$, PH6.0 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中性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NEX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0004) \div 0.7475 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 223 \times (\Delta A + 0.0004) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 40 $^{\circ}\text{C}$, PH6.0 条件下, 每 1 万个细菌或细胞每分钟分解木聚糖产生 1nmol 还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NEX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0004) \div 0.7475 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.446 \times (\Delta A + 0.0004) \div W \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 40 $^{\circ}\text{C}$, PH6.0 条件下, 每毫升液体样本每分钟分解木聚糖产生 1nmol 木糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{NEX 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0004) \div 0.7475 \times 10^3] \div V1 \div T \times D = 223 \times (\Delta A + 0.0004) \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.1mL;

T---反应时间, 60min;

W---样本质量, g;

木糖的分子量---150.131;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (5mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 100 μL 标准品+100 μL 蒸馏水+250 μL 试剂二, 混匀, 沸水浴 (95-100 $^{\circ}\text{C}$) 5min, 冷却至室温, 再加 800 μL 蒸馏水, 混匀后取出 200 μL 待检液至 96 孔板中, 于 540nm 处读取吸光值 A。根据结果即可制作标准曲线。