

碱性木聚糖酶 (Basic Xylanase, BAX) 测定试剂盒说明书

微量法 100T/48S

注意：正式测定之前选择 2+3 个预期差异大的样本做预测定。

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碱的原料细胞壁以及β-葡聚糖，降低酿造碱物料的粘度，促进有效物质的释放，以及降低饲料碱的非淀粉多糖，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碱，BAX 一般分离自最适生长 pH 为 9+11 的微生物。

测定原理：

BAX 在碱性环境碱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。

自备实验用品及仪器：

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。

试剂组成和配制：

缓冲液：液体 65mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃ 避光保存。（若出现白色絮状或颗粒状沉淀，可 60℃ 加热溶解后使用）。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

粗酶提取：

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 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℃，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。

2、操作表

| | 对照管 | 测定管 |
|--|-----|-----|
| 样品 (μL) | 60 | 60 |
| 缓冲液 (μL) | 90 | 90 |
| 试剂一 (μL) | | 60 |
| 试剂二 (μL) | 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） | | |
| 试剂一 (μL) | 60 | |
| 试剂二 (μL) | | 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。 | | |

BAX 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. 按液体体积活力计算:

酶活定义: 50℃, pH9.0 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碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mL)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \end{aligned}$$

2. 按蛋白浓度计算:

酶活定义: 50℃, pH9.0 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碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按鲜重计算:

酶活定义: 50℃, pH9.0 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碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \div W \end{aligned}$$

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

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: $y = 1.4216x - 0.0293$, $R^2 = 0.9985$

1. 按液体体积活力计算:

酶活定义: 50℃, pH9.0 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碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mL)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \\ &= 782 \times (\Delta A + 0.0293) \end{aligned}$$

2. 按蛋白浓度计算:

酶活定义: 50℃, pH9.0 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碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 782 \times (\Delta A + 0.0293) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按鲜重计算:

酶活定义: 50℃, pH9.0 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碱性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{BAX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W \\ &= 782 \times (\Delta A + 0.0293) \div W \end{aligned}$$

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

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。

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。