

中性木聚糖酶（NEX）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：AC10471

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，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
缓冲液	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制：

标准品：10mg 木糖。临用前加入 667 μ L 蒸馏水配成 100 μ mol/mL 的标准品溶液，再用水稀释 50 倍得到 2 μ mol/mL 的木糖标准液，备用。

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：称取约 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：称约 1mg，加缓冲液 1mL，震荡充分溶解。

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、将上清液/酶溶液用蒸馏水稀释十倍后置冰上待测。
- 3、样本测定：

加入试剂	对照管	测定管	标准管	空白管
样本 (μL)	200	200		
标准溶液 (μL)			200	
蒸馏水 (μL)				200
缓冲液 (μL)	300	300	300	300
试剂一 (μL)	-	200	200	200
混匀，盖紧瓶盖，50°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 (μL)	200	-		
试剂二 (μL)	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对照管、A测定管、A标准管、A空白管，计算ΔA测定=A测定管-A对照管，ΔA标准=A标准管-A空白管。				

三、NEX计算公式

1. 发酵液 NEX 活力计算：

酶活定义：50°C，pH6.0 条件下每毫升发酵液每分钟分解木聚糖产生 1μmol 还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

$$\text{NEX 活力 (U/mL)} = [\Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准})] \div T = 0.067 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}$$

2. 酶干粉 NEX 活力计算：

酶活定义：50°C，pH6.0 条件下，每毫克酶每分钟分解木聚糖产生 1μmol 还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NEX 活力 (U/mg)} &= [\Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准})] \times V \text{ 样本} \times 10 \div (V \text{ 样本} \times W \text{ 酶} \div V \text{ 提取}) \div T \\ &= 0.67 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \text{ 酶} \end{aligned}$$

3. 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，pH6.0 条件下，每 mg 组织蛋白每分钟分解木聚糖产生 1μmol 还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NEX 活力 (U/mg prot)} &= [\Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准})] \times V \text{ 样本} \times 10 \div (V \text{ 样本} \times Cpr) \div T \\ &= 0.67 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div Cpr \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算：

酶活定义：50°C，pH6.0 条件下，每 g 组织每分钟分解木聚糖产生 1μmol 还原糖所需的酶量为一个中性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NEX 活力 (U/g 质量)} &= [\Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准})] \times V \text{ 样本} \times 10 \div (V \text{ 样本} \times W \div V \text{ 提取}) \div T \\ &= 0.67 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \end{aligned}$$

C 标准：木糖标准溶液，2μmol/mL；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：提取液体积，1mL；10：样本稀释倍数。

注意事项：

吸光度变化应该控制在 0.01~1.5 之间，否则加大样本量或稀释样本，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。

实验实例：

1、取 0.1g 柳树叶加入 1mL 缓冲液进行匀浆研磨，取上清用蒸馏水稀释十倍后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=1.246-0.973=0.273， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.905-0.238=0.667，按样本质量计算酶活得：

NEX 活力 (U/g 质量) = $0.67 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\div W = 0.67 \times 0.273 \div 0.667 \div 0.1 = 2.742$ U/g 质量。