

酸性木聚糖酶（ACX）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：AC10474

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，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
缓冲液	液体 90 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 2 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	液体 4 mL×1 瓶	4℃保存
标准品	粉剂×1 支	4℃保存

溶液的配制：

1、试剂一：临用前加入 6mL 蒸馏水，4℃保存 6 个月。

2、标准品：10mg 木糖。临用前加入 667 μ L 缓冲液配成 100 μ mol/mL 的标准品溶液，4℃保存一个月。再用缓冲液稀释 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，酸性木聚糖酶（ACX）一般分离自耐酸的真菌，细菌及部分霉菌。

ACX 在酸性环境下能将木聚糖降解成还原性寡糖和单糖，进一步在沸水浴条件下与 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 ACX 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、天平、低温离心机、可调式移液器、恒温水浴锅、研钵/匀浆器、微量玻璃比色皿/96 孔板、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、发酵液：发酵液于 8000rpm，4℃，离心 15min，取上清置于冰上待测。

2、酶干粉：称约 1mg，加 1mL 缓冲液溶解，上清液稀释 10 倍待测。

3、组织样本：称约 0.1g 组织，加入 1mL 缓冲液，冰上充分研磨。8000rpm，4℃，离心 15min，取上清置于冰上待测。

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，蒸馏水调零。

2、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	-	-
木糖标准品	-	-	-	60
缓冲液	90	90	150	90
试剂一	-	60	60	60
充分混匀，50℃水浴中反应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
试剂三	30	30	30	30
充分混匀，沸水浴中显色5min（注意不要让盖子爆开，以免进水改变了反应体系），冷却后吸取200 μL 至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测定、A对照、A标准、A空白。				

三、ACX活性计算

1、发酵液 ACX 活力计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (U/mL)} &= C \text{ 标准} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div T \times F \\ &= 0.067 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times F \end{aligned}$$

C 标准：木糖标准溶液浓度，2 $\mu\text{mol/mL}$ ；T：反应时间，30min；F：样本稀释倍数。

2、酶干粉 ACX 活力计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (U/mg)} &= 10 \times C \text{ 标准} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times V \text{ 提取} \div W_1 \div T \\ &= 0.67 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div W_1 \end{aligned}$$

10：样本稀释倍数，10 倍；C 标准：木糖标准溶液浓度，2 $\mu\text{mol/mL}$ ；V 提取：加入缓冲液体积，1mL；W₁：酶干粉重量，mg；T：反应时间，30min。

3、组织中 ACX 活力计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 条件下，每 mg 组织蛋白每分钟分解木聚糖产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (U/mg prot)} &= C \text{ 标准} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times V \text{ 样本} \div (V \text{ 样本} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F \\ &= 0.067 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算：

酶活定义：50°C，pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (U/g 质量)} &= C \text{ 标准} \times (\text{A 测定}-\text{A 对照}) \div (\text{A 标准}-\text{A 空白}) \times V \text{ 提取} \div W_2 \div T \times F \\ &= 0.067 \times (\text{A 测定}-\text{A 对照}) \div (\text{A 标准}-\text{A 空白}) \div W_2 \times F \end{aligned}$$

F: 样本稀释倍数 C 标准: 木糖标准溶液浓度, 2 μ mol/mL; 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。

注意事项:

1、吸光度变化应该控制在 0.01~1.5 之间，否则加大样本量或用缓冲液稀释样本，注意计算公式中参与计算的稀释倍数要相应改变。

实验实例:

1、取 0.1g 草莓加入 1mL 缓冲液进行匀浆研磨，取上清用缓冲液稀释十倍后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得 A 测定=1.432、A 对照=1.317、A 标准=0.515、A 空白=0.103，按样本质量计算酶活得：

$$\text{ACX 活力 (U/g 质量)} = 0.067 \times (\text{A 测定}-\text{A 对照}) \div (\text{A 标准}-\text{A 空白}) \div W_2 \times F = 1.87 \text{ U/g 质量。}$$