

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ΔA=A测定管+A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, R2 = 0.9985

1. 按液体体积活力计算：

酶活定义：50°C, 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。

$$\begin{aligned} \text{BAX活力 (nmol/min/mL)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 106 \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \end{aligned}$$

2. 按蛋白浓度计算：

酶活定义：50°C, 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。

$$\begin{aligned} \text{BAX活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 106 \div \text{Cpr} \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按鲜重计算：

酶活定义：50°C, 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。

$$\begin{aligned} \text{BAX活力 (nmol/min/g鲜重)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 2.8432 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 106 \div W \\ &= 391 \times (\Delta A + 0.0293) \div W \end{aligned}$$

150：木糖的分子量；T：反应时间，30min；稀释倍数=V反总÷V样=300μL÷60μL=5；

106：转化因子，即1mg/mL=106ng/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, R2 = 0.9985

1. 按液体体积活力计算：

酶活定义：50°C, 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。

$$\begin{aligned} \text{BAX活力 (nmol/min/mL)} &= (\Delta A + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 106 \\ &= 782 \times (\Delta A + 0.0293) \end{aligned}$$

2. 按蛋白浓度计算：

酶活定义：50°C, 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。

$$\text{BAX活力 (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 106 \div \text{Cpr}$$

$$= 782 \times (\Delta A + 0.0293) \div \text{Cpr}$$

3. 按鲜重计算:

酶活定义: 50°C, 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。

$$\text{BAX活力 (nmol/min/g鲜重)} = (\Delta A + 0.0293) \div 1.4216 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 106 \div W$$

$$= 782 \times (\Delta A + 0.0293) \div W$$

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;

106: 转化因子, 即1mg/mL=106ng/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°C保存, 保质期3个月, 建议尽快使用。