

## 酸性木聚糖酶（Acidic Xylanase, ACX）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中的原料细胞壁以及  $\beta$ -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，ACX 一般分离自耐酸的真菌，细菌及部分霉菌。

### 测定原理：

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。

### 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 90mL×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（ $\mu\text{L}$ ）		60
灭活的样品（ $\mu\text{L}$ ） （95℃ 水浴 15min）	60	
缓冲液（ $\mu\text{L}$ ）	90	90
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	60	60

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)		
试剂二 (μL)	90	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。		

**ACX 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：  $y = 2.5554x - 0.002$  ，  $R^2 = 0.9983$

1. 按液体体积活力计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/mL)} &= (\Delta A + 0.002) \div 2.5554 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \\ &= 435 \times (\Delta A + 0.002) \end{aligned}$$

2. 按蛋白浓度计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.002) \div 2.5554 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 435 \times (\Delta A + 0.002) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按鲜重计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.002) \div 2.5554 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W \\ &= 435 \times (\Delta A + 0.002) \div W \end{aligned}$$

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；

10<sup>6</sup>：转化因子，即 1mg/mL=10<sup>6</sup>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：  $y = 1.2777x - 0.002$  ，  $R^2 = 0.9983$

1. 按液体体积活力计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/mL)} &= (\Delta A + 0.002) \div 1.2777 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \\ &= 869.6 \times (\Delta A + 0.002) \end{aligned}$$

2. 按蛋白浓度计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 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酸性木聚糖酶的活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACX 活力 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.002) \div 1.2777 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div \text{Cpr} \\ &= 869.6 \times (\Delta A + 0.002) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按鲜重计算：

酶活定义：50℃，pH4.8 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酸性木

聚糖酶的活力单位。

ACX 活力 (nmol/min/g 鲜重) =  $(\Delta A + 0.002) \div 1.2777 \div 150 \div T \times \text{稀释倍数} \times 10^6 \div W$

$$= 869.6 \times (\Delta A + 0.002) \div W$$

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。
2. 试剂盒 2-8°C 保存, 保质期 3 个月, 建议尽快使用。