木聚糖酶检测试剂盒(DNS 微板法)

产品简介:

木聚糖(Xylan)是植物细胞壁的主要组成成分，它也是可利用的丰富的半纤维素。木聚糖酶(Xylanase)指能专一降解半纤维素、木聚糖为低聚木糖和木糖的一组酶的总称。木聚糖酶主要来源于细菌和真菌，包括厌氧菌、需氧菌、嗜温微生物、嗜热微生物和极端微生物等。

木聚糖酶主要包括 3 类：①β-1,4-D-内切木聚糖酶(EC3.2.1.8)，从木聚糖主链的内部切割β-1，4 糖苷键，使木聚糖溶液的黏度迅速降低；②β-1,4-D-外切木聚糖酶(EC3.2.1.92)，以单个木糖为切割单位，作用于木聚糖的非还原性末端，使反应体系还原性不断增加；③β-木糖苷酶(EC3.2.1.37)，切割低聚木糖，水解产物主要为木糖、木二糖及木三糖等低聚木糖。

根据酶的理化特性，木聚糖酶又可分为 2 大类：即分子量小于 30ku 的碱性木聚糖酶和分子量大于 30ku 的酸性木聚糖酶。通常细菌可以同时产生酸、碱性木聚糖酶，但真菌通常只产生低分子量的碱性木聚糖酶。从本质上讲，木聚糖酶都具有外切酶和内切酶活性，只是活性高低不同而已。作为一种工业用酶制剂，木聚糖酶具有潜在的应用价值。首先木聚糖酶可以将农业和木材工业的废物中的木聚糖转化为木糖；其次，Wong 等建议木聚糖酶可应用在果汁澄清、咖啡、植物油和淀粉提取加工过程中。

木聚糖酶检测试剂盒(DNS 微板法)检测原理是：木聚糖酶能将木聚糖降解成还原性寡糖和单糖，在沸水浴条件下可以与 3，5 -二硝基水杨酸(DNS)试剂发生显色反应。反应液颜色的深度与酶解产生的还原糖量成正比，而还原糖的生成量又与反应液中木聚糖酶的活力成正比。因此，通过测定反应液颜色的强度，可以计算反应液中木聚糖酶的活力。本产品仅用于科研领域，不用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTE0195 100T	Storage
试剂 A: 木糖标准(10mg/ml)	1ml	4℃
试剂 B: Assay buffer	2×100ml	RT
试剂 C: 木聚糖	0.5g	RT
试剂 D: NH 水溶液(3×)	30ml	RT
试剂 E: YS 溶液	5ml	RT
试剂 F: DNS 试剂	10ml	RT 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、去离子水或蒸馏水

2、电子天平(精度 0.0001g)、pH 计、磁力搅拌器、移液器、小烧杯

3、振荡器、纱布、离心机、离心管或试管、三角瓶、容量瓶、

4、水浴锅、电热炉、培养箱、酶标仪、酶标板

操作步骤(仅供参考):

1、配制木聚糖溶液:准确称取 0.15g 木聚糖,使充分溶解于 8ml 去离子和 5ml NH 水溶液(3×)中,通过 pH 计测定,用 YS 溶液调节 pH 至 5.5~5.6,补水至 15ml,木聚糖终浓度为 10mg/ml,4℃避光保存,48 小时有效。

2、配制 NH 水溶液(1×):取 1 份 NH 水溶液(3×)和 2 份去离子水混合即成。

3、标准曲线绘制:取 8 支离心管按下表设置,准确吸取木糖标准(10mg/ml)与 Assay buffer,即得不同浓度的木糖梯度标准。

加入物(ml)	1	2	3	4	5	6	7
木糖标准(10mg/ml)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07
Assay buffer	0.99	0.98	0.97	0.96	0.95	0.94	0.93
木糖标准(mg/ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7

取 1 支离心管,加入 0.08mlAssay buffer 和 0.1mlDNS 试剂,混匀,沸水浴加热 5min,自来水冷却至室温,加 NH 水溶液(1×)0.32ml,即为空白管。另取 7 支离心管,加入 0.04ml 37℃预热的 Assay buffer、0.04ml 木糖梯度标准和 0.1mlDNS 试剂,混匀,沸水浴加热 5min,自来水冷却至室温,加 NH 水溶液(1×)0.32ml,即为标准管。以空白管调零,酶标仪测定 540nm 处各管的吸光度。

4、准备样品:

①固体样品按照下表中建议的称样量称取试样两份,精确至 0.001 g。 加入 4ml Assay buffer,充分溶解,并定容至 10 ml,在 4 ℃条件下避光保存 1~2h。1000g 离心 3~5min,取上清液,再用 Assay buffer 做适当稀释、定容(稀释后的酶液中木聚糖酶活力最好能控制在 0.04~0.10U/ml 之间)。

木聚糖酶活力/(U/g 或者 U/ml)	称量样品/g(或者 ml)
≥2000	0.01~0.02
500~1999	0.02~0.05
200~499	0.05~0.1
50~199	0.1~0.2
10~49	0.2~0.5

②液体样品可以直接用 Assay buffer 稀释、定容(稀释后的酶液中木聚糖酶活力最好能控制在 0.04~0.10 U/ml 之间）。如果样品稀释后酶液的 pH 偏离 5.4~5.7，需要用乙酸溶液或氢氧化钠溶液校正至 5.4~5.7。

5、测定样品

①取适量的木聚糖溶液和酶提取液置于不同的离心管中，37°C 平衡 20 min；木聚糖溶液使用之前应充分摇匀。

②取 2 支离心管按下表设置依次加入相应试剂：

加入物(ml)	对照管	测定管
酶提取液	0.04	0.04
Assay buffer	0.04	-
木聚糖溶液	-	0.04
37℃水浴 30min		
DNS 试剂	0.1	0.1
立即摇匀，放入沸水浴中显色 5min， 立即取出，流水冷却至室温，加 NH 水溶液(1×)0.32ml		

以空白管调零，酶标仪测定 540nm 处对照管和测定管的吸光度(分别记为 A_1、A_0)。

计算:

木聚糖酶活力单位定义：在 37℃ pH5.5 的条件下，每分钟从浓度为 5mg/ml 的木聚糖溶液中降解释放 1 μmol 还原糖所需要的酶量为一个酶活力单位U。根据酶活性定义，可计算出样品中的木聚糖酶活性。

以系列木糖标准(mg/ml) (1~7 号)为横坐标，以相应的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。根据标准曲线计算出酶提取液(对照管和测定管)的吸光度相对应的木糖浓度 C，根据下式再计算木聚糖酶活性。

$D_1 = N\times(C_1-C_0)\times1000/(1\times M\times t) = N\times(C_1-C_0)\times1000/4506$

$D_2 = D_1\times V_0/m$

式中：D_1——稀释酶液中木聚糖酶的活力，单位为 U/ml

N——样品稀释倍数

C_1——样品测定管木糖浓度，单位为 mg/ml

C_0——样品对照管木糖浓度，单位为 mg/ml

1000——转换因子，1mmol=1000μmol

M——木糖的摩尔质量，单位为 g/mol（=150.2）

t——酶与底物的反应时间，单位为 min（=30）

D_2——固体样品中木聚糖酶的活力，单位为 U/g

V_0——固体样品的酶提取液总体积，单位为 ml

m——称取样品的质量，单位为 g

注意事项：

1、 木糖标准应避免反复冻融，以免失效或效率下降。

2、 木聚糖易溶于碱性溶液中，加入 YS 溶液后呈悬浊状，静置后可能分层，为减少实验误差，后续实验使用时应摇匀。

3、 待测酶提取液样品如不能及时测定，应置于-20℃保存，3 天内稳定。

4、 如果样品酶活性过高，应用 Assay buffe 稀释酶提取液后重测，结果乘以稀释倍数。

5、 木聚糖酶的最适 pH 一般在 5.5。如果样品稀释后酶液的 pH 偏离 5.4~5.7，需要用乙酸溶液或氢氧化钠溶液校正至 5.4~5.7。

6、 本试剂盒适用于饲料等样品的木聚糖酶活性的测定。

7、 Assay buffer 如不够用，可用乙酸钠缓冲液(0.1mol/L,pH5.5-6.0)替代。

8、 DNS 试剂、NH 水溶液(2×) 和 YS 溶液有一定的腐蚀性和刺激性，应小心操作。

9、 沸水浴实验操作时，应当选择带螺旋盖的离心管。

10、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

11、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：6 个月有效。室温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCDZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)
GCTE0190	纤维素酶检测试剂盒(DNS 比色法)
GCTO1013	丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)