

内切- β -1,4-葡聚糖酶/纤维素酶试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介：

内切- β -1,4-葡聚糖酶 (EC3.2.1.4) 存在于细菌、真菌和动物体内，是纤维素酶系的组份之一，这类酶随机水解 β -1,4-糖苷键，将无定形长链纤维素分子截短，将其分解成葡萄糖、纤维二糖、纤维三糖等各种类型的还原糖，在碱性条件下，产生的还原糖能与3,5-二硝基水杨酸反应生成棕红色物质，该物质在540nm下有最大吸收峰，即可得出内切- β -1,4-葡聚糖酶的酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 33mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存	临用前加 16.5mL 试剂一，80°C水浴，搅拌至溶解，仍 4°C保存。
试剂三	液体 33mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、内切- β -1,4-葡聚糖酶/纤维素酶活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

- ① 组织：称取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆，4°C放置 10min；12000rpm，4°C离心 5min；弃上清，留沉淀，向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀，4°C放置 10min；12000rpm，4°C离心 5min；弃上清，留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液，涡旋混匀，4°C放置 10min；12000rpm，4°C离心 10min；留上清，弃沉淀。上清液置冰上待测。
- ② 细菌/培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500：1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本：若是澄清液体，直接检测，若液体样本浑浊，需 4°C×12000rpm，离心 10min，取上清液检测。

2、上机检测：

- 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 所有试剂解冻至室温（25°C），在 EP 管中依次加入：

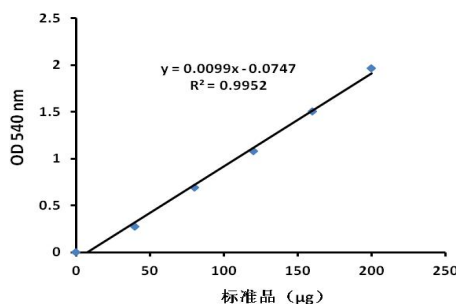
试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一		300
试剂二	300	
37°C孵育 60min		

试剂三	300	300
混匀, 95°C水浴 5min, 取出后用自来水或冰水冷却至室温, 取全部澄清液体于 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 在 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管 (每个样本做一个对照管)。		

【注】若 ΔA 在零附近, 可增加样本取样质量 W 或增加样本加样体积 V1 (如增至 150 μ L, 则试剂三相应减少), 则改变后的 W 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程为 $y = 0.0099x - 0.0747$; x 为标准品质量 (μ g), y 为 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算

单位定义: 每毫克组织蛋白每小时催化产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶活力}(\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0747) \div 0.0099] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 1010.1 \times (\Delta A + 0.0747) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算

单位定义: 每克组织每小时催化产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶活力}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0747) \div 0.0099] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 1010.1 \times (\Delta A + 0.0747) \div W \end{aligned}$$

4、按细菌/细胞密度计算

单位定义: 每 1 万个细菌或细胞每小时催化产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶活力}(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0747) \div 0.0099] \div (500 \times V1 \div V) \\ &\div T = 2 \times (\Delta A + 0.0747) \end{aligned}$$

5、按液体体积计算

单位定义: 每毫升液体每小时催化产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶活力}(\mu\text{g/h/mL}) &= [(\Delta A + 0.0747) \div 0.0099] \div V1 \div T \\ &= 1010.1 \times (\Delta A + 0.0747) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.1mL;

T---反应时间, 60min=1 小时;

W---样本质量, g;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (2mg/mL): 从标准品管中称量取出 4mg 至一新 EP 管中, 再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 2mg/mL 的葡萄糖 (母液需在两天内用且-20°C保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据对照管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。