

内切- β -1,4-葡聚糖酶/羧甲基纤维素酶试剂盒说明书 (微板法 96 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 110mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 9mL 试剂一, 80℃ 水浴, 搅拌至溶解, 仍 4℃ 保存。
试剂三	液体 45mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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 0.1g 组织, 进行冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

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℃ 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℃ × 12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入:

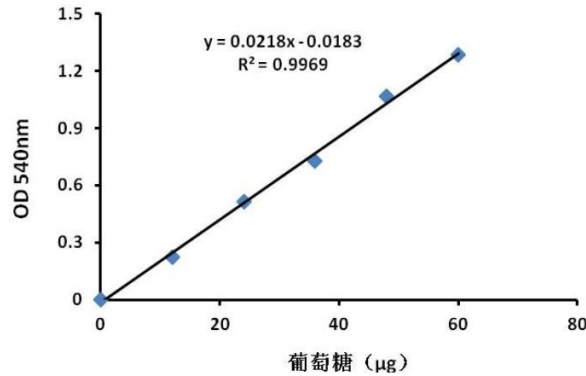
试剂名称	测定管	对照管
样本	20	20
试剂二	80	
蒸馏水		80
37℃ 孵育 30min		
试剂三	100	100
混匀, 95℃ 水浴 5min, 取出后用自来水或冰水冷却至室温		
蒸馏水	200	200
混匀, 取 200 μ L 于 96 孔板中, 在 540nm 处读取吸光值 A,		

$\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管（每个样本做一个对照管）。

【注】若差值较小（如在零附近徘徊），可以延长孵育时间 30min 至一个小时，则改变后的时间需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 0.0218x - 0.0183$ ；x 为标准品质量（ μg ），y 为 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 $1\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0183) \div 0.0218] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T$$

$$= 76.5 \times (\Delta A + 0.0183) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算

单位定义：每克组织每分钟催化产生 $1\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0183) \div 0.0218] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 76.5 \times (\Delta A + 0.0183) \div W$$

4、按细菌/细胞密度计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 $1\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0183) \div 0.0218] \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 0.153 \times (\Delta A + 0.0183)$$

5、按液体体积计算

单位定义：每毫升液体每分钟催化产生 $1\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0183) \div 0.0218] \div V1 \div T$$

$$= 76.5 \times (\Delta A + 0.0183)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02 mL；

T---反应时间，30 min；

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（ $3\text{mg}/\text{mL}$ ）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且 -20°C 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3. mg/mL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。