

外切- β -1,4-葡聚糖酶/纤维二糖水解酶 (CBH) 试剂盒说明书 (微板法 96 样)

一、产品简介:

外切- β -1,4-葡聚糖酶又称纤维二糖水解酶 (CBH) (EC 3.2.1.91) 存在于细菌、真菌和动物体内,是纤维素酶系的组份之一,该酶作用于 β -1,4-糖苷键,每次切下一个纤维二糖(还原糖)分子,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,即可得出外切- 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 32mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 16mL 试剂一,充分混匀呈分散状态,每次用前 务必混匀 。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体 mg×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、外切- 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 0.2g 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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃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 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 所有试剂解冻至室温(25℃),试剂二使用前**务必混匀**。

③ 在 EP 管中依次加入:

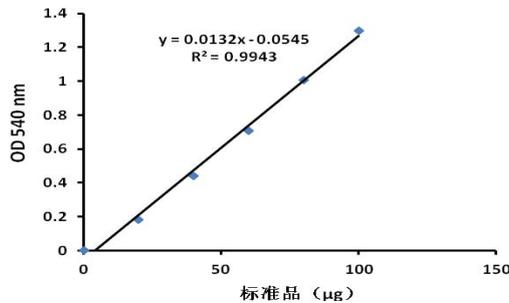
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一		150
试剂二	150	
37℃ 孵育 60min		
试剂三	150	150
混匀,95℃水浴 5min,取出后用自来水或冰水冷却至室温,		

取 200 μ L 澄清液体于 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 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 80 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 $y = 0.0132x - 0.0545$ ；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。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0545) \div 0.0132] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 1515.2 \times (\Delta A + 0.0545) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0545) \div 0.0132] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 1515.2 \times (\Delta A + 0.0545) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0545) \div 0.0132] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 3 \times (\Delta A + 0.0545) \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g/min/mL}) &= [(\Delta A + 0.0545) \div 0.0132] \div V1 \div T \\ &= 1515.2 \times (\Delta A + 0.0545) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.05 mL；

T---反应时间，60 min=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 $^{\circ}$ 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。