

外切-β-1,4-葡聚糖酶/纤维二糖水解酶（CBH）试剂盒说明书

（货号：G0534W 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，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

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（10⁴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：

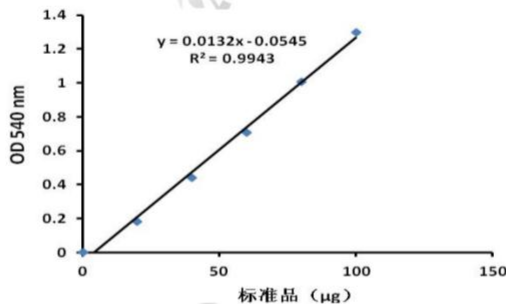
试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一		150
试剂二	150	
37℃孵育 60min		
试剂三	150	150
混匀，95℃水浴 5min，取出后用自来水或冰水冷却至室温，		

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 小于 0.01，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（最多增至 150 μ L），则试剂一和二相应减少），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。

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

$$=1515.2\times(\Delta A+0.0545)\div\text{Cpr}$$

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。

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

$$=1515.2\times(\Delta A+0.0545)\div W$$

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。

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

$$=3\times(\Delta A+0.0545)$$

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。

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

$$=1515.2\times(\Delta A+0.0545)$$

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，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℃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。