

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: G05103F 分光法 48 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, 该酶催化4-硝基苯-β-D-纤维二糖苷水解生成对硝基苯酚 (PNP), 该物质 (PNP) 在405nm下有最大吸收峰, 进而通过计算得出外切-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 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 mg×3 支	4°C保存	临用前甩几下或离心使粉体落入底部, 每支再加 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 50mL×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、外切-β-1,4-葡聚糖酶 (CBH) 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 组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 加入 1mL 经预冷提取液, 冰浴匀浆, 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 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。

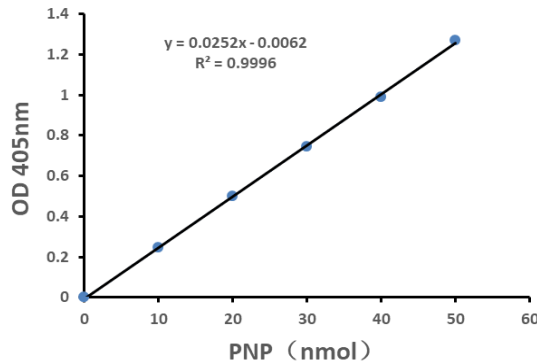
2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。
- ② 试剂一和二可提前于 37 度水浴锅孵育 15-30min。在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	60	
蒸馏水		60
试剂二	150	150
混匀, 37°C孵育 30min		
试剂三	450	450
混匀, 室温放置 (25°C) 2min, 取全部澄清液体于 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 在 405nm 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)。		

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 0.0252x - 0.0062$ ；x 为标准品摩尔质量 (nmol)，y 为 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算：

定义：每毫克组织蛋白每小时催化产生 1nmol 对硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力(nmol/h/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0062) \div 0.0252] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 793.7 \times (\Delta A + 0.0062) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

定义：每克组织每小时催化产生 1nmol 对硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力(nmol/h/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0062) \div 0.0252] \div (\text{W} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 793.7 \times (\Delta A + 0.0062) \div \text{W} \times D \end{aligned}$$

4、按细菌/细胞密度计算：

定义：每 1 万个细菌或细胞每小时催化产生 1nmol 对硝基苯酚 (PNP) 为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力(nmol/h/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0062) \div 0.0252] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 1.6 \times (\Delta A + 0.0062) \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

定义：每毫升液体每小时催化产生 1nmol 对硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力(nmol/h/mL)} &= [(\Delta A + 0.0062) \div 0.0252] \div V1 \div T \times D \\ &= 793.7 \times (\Delta A + 0.0062) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.1mL；

T---反应时间，30min=1/2 小时；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，万；

D---稀释倍数，未稀释就是 1；

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 (20 $\mu\text{mol/mL}$)：标准品管甩几下使粉体落入底部，再加 0.7mL 蒸馏水混匀溶解即 20 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准品母液。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 。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。