

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: G0534F 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 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,充分混匀呈分散状态,每次用前 务必混匀 。
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、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°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 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),试剂二使用前务必混匀。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

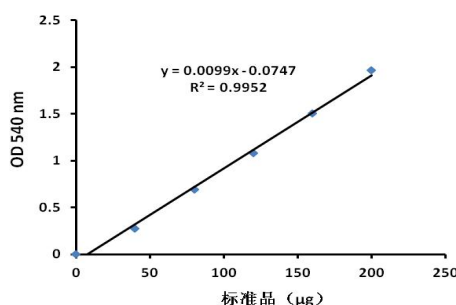
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一		300
试剂二	300	
37°C 孵育 60min		
试剂三	300	300

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, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (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 (最多增至 250 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 $y = 0.0099x - 0.0747$; 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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

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。