

## 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℃ 保存	
试剂一	液体 33mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 16.5mL 试剂一，充分混匀呈分散状态，每次用前 <b>务必混匀</b> 。
试剂三	液体 33mL×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：

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℃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 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 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℃），试剂二使用前务必混匀。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

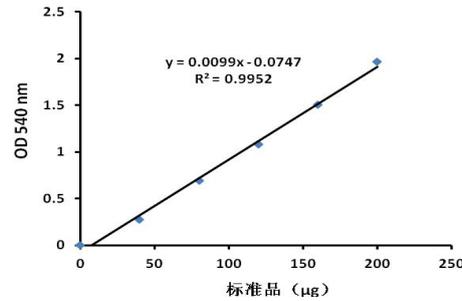
试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一		300
试剂二	300	
37℃ 孵育 60min		
试剂三	300	300

混匀, 95℃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,  $\Delta A = A$  测定管 - A 对照管 (每个样本做一个对照管)。

【注】若  $\Delta A$  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 $\mu$ 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  $y = 0.0099x - 0.0747$ ; x 为标准品质量 ( $\mu$ g), y 为  $\Delta A$ 。



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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且 -20℃ 保存)。
- 2 把母液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。