

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 务必混匀 。
试剂三	液体 33mL×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:

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 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:

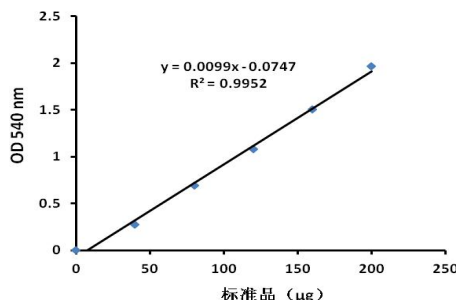
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一		300
试剂二	300	
37℃孵育 60min		
试剂三	300	300

混匀, 95°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, 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 (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。