

内切-β-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介:

内切-β-1,4-葡聚糖酶 (EC3.2.1.4) 存在于细菌、真菌和动物体内, 是纤维素酶系的组份之一, 也常被称为纤维素酶。这类酶随机水解β-1,4-糖苷键, 将无定形长链纤维素分子截短, 将其分解成葡萄糖、纤维二糖、纤维三糖等各种类型的还原糖, 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, 即可得出内切-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 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加 14mL 试剂一, 80℃水浴, 搅拌至溶解, 仍 4℃保存。
试剂三	液体 40mL×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、内切-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 0.1g 组织, 进行冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

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 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 在 EP 管中依次加入:

试剂名称	测定管	对照管
样本	60	60
试剂二	240	
蒸馏水		240
	37℃孵育 30min	
试剂三	300	300

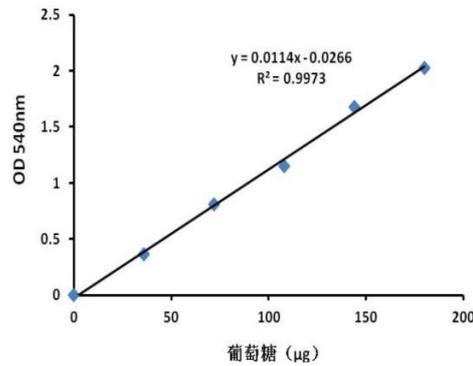
混匀, 95℃水浴 5min, 取出后用自来水或冰水冷却至室温

蒸馏水	600	600
混匀，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中， 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】若差值较小（如在零附近徘徊），可以延长孵育时间 30min 至一个小时，
则改变后的时间需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 0.0114x - 0.0266$ ；x 为标准品质量 (μg)，y 为 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 $1\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0266) \div 0.0114] \div (\text{Cpr} \times V_1) \div T \\ &= 48.7 \times (\Delta A + 0.0266) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算

单位定义：每克组织每分钟催化产生 $1\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0266) \div 0.0114] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 48.7 \times (\Delta A + 0.0266) \div W \end{aligned}$$

4、按细菌/细胞密度计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 $1\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0266) \div 0.0114] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ &= 0.098 \times (\Delta A + 0.0266) \end{aligned}$$

5、按液体体积计算

单位定义：每毫升液体每分钟催化产生 $1\mu\text{g}$ 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0266) \div 0.0114] \div V_1 \div T \\ &= 48.7 \times (\Delta A + 0.0266) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.06 mL；

T---反应时间，30 min；

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 ($3\text{mg}/\text{mL}$)：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需两天内用且 -20°C 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。