

## 内切-β-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶(CL)试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX036-48 微板法 48 样)

有效期: 3 个月

### 测定意义:

CL (EC 3.2.1.4) 存在于细菌、真菌和动物体内, 能够催化纤维素降解, 是一类可广泛应用于医药、食品、棉纺、环保及可再生资源利用等领域的酶制剂。

### 测定原理:

采用3,5-二硝基水杨酸法测定CL催化纤维素降解产生的还原糖的含量。

### 需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂的组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂一: 液体 5mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂二: 液体 20mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂三: 液体 5mL×1 瓶, 4℃保存;

### 样品测定的准备:

1、细菌或细胞: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声冰浴破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3S 秒, 间隔 10S, 重复 30 次); 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、组织: 称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液, 冰浴中匀浆。8000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3、液体样本: 若是澄清液体, 直接检测, 若液体样本浑浊, 需 4℃, 8000g, 离心 10min, 取上清液检测。

### 测定步骤:

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 550nm, 蒸馏水调零。

2、加样表 (在 EP 管中依次加入下列试剂):

| 试剂名称 (μL) | 对照管 | 测定管 |
|-----------|-----|-----|
| 试剂一       | 50  | 50  |
| 试剂二       | 200 | 200 |
| 双蒸水       | 50  | 50  |
| 样本        |     | 50  |
| 煮沸的样本     | 50  |     |

混匀, 40℃准确水浴 30min 后沸水浴 15min, (盖紧, 防止水分散失), 得糖化液

|     |    |    |
|-----|----|----|
| 糖化液 | 15 | 15 |
| 试剂三 | 35 | 35 |

混匀, 沸水浴显色 15min (盖紧, 防止水分散失), 冷却

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 双蒸水 | 250 | 250 |
|-----|-----|-----|

混匀, 取 200 μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 测 550nm 下吸光值 A, 计算  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

## CL 活性计算

### a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件下测定回归方程为  $y = 0.3356x - 0.012$ ;  $x$  为标准品浓度 (mg/mL),  $y$  为吸光值。

#### 1、按照蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1  $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL 活力(U/mg prot)} = 1000 \times [(A+0.012) \div 0.3356 \times V_{\text{总}}] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 695 \times (A+0.012) \div C_{\text{pr}}$$

#### 2、按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1  $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL 活力(U/g 鲜重)} = 1000 \times [(A+0.012) \div 0.3356 \times V_{\text{总}}] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 695 \times (A+0.012) \div W$$

#### 3、按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化产生 1  $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL 活力(U/10}^4 \text{ cell)} = 1000 \times [(A+0.012) \div 0.3356 \times V_{\text{总}}] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 1.39 \times (A+0.012)$$

#### 4、按液体体积计算

单位的定义: 每 ml 液体在反应体系中每分钟催化产生 1  $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL 活力(U/mg prot)} = 1000 \times [(A+0.012) \div 0.3356 \times V_{\text{总}}] \div V_{\text{样}} \div T \\ = 695 \times (A+0.012)$$

1000: 1mg/mL=1000 $\mu$ g/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.35mL; V 样: 加入样本体积, 0.05 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 30 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

### b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定回归方程为  $y = 0.1678x - 0.012$ ;  $x$  为标准品浓度 (mg/mL),  $y$  为吸光值。

#### 1、按照蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1  $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL 活力(U/mg prot)} = 1000 \times [(A+0.012) \div 0.1678 \times V_{\text{总}}] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 1391 \times (A+0.012) \div C_{\text{pr}}$$

#### 2、按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1  $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL 活力(U/g 鲜重)} = 1000 \times [(A+0.012) \div 0.1678 \times V_{\text{总}}] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 1391 \times (A+0.012) \div W$$

#### 3、按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化产生 1  $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL 活力(U/10}^4 \text{ cell)} = 1000 \times [(A+0.012) \div 0.1678 \times V_{\text{总}}] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T \\ = 2.78 \times (A+0.012)$$

#### 4、按液体体积计算

单位的定义: 每 ml 液体在反应体系中每分钟催化产生 1  $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL 活力(U/mg prot)} = 1000 \times [(A+0.012) \div 0.1678 \times V_{\text{总}}] \div V_{\text{样}} \div T$$

$$=1391 \times (A + 0.012)$$

1000: 1mg/mL=1000ug/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.35mL; V 样: 加入样本体积, 0.05 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 30 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

艾迪生