

## 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: ADS-W-TDX072 微板法 96 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。该酶催化4-硝基苯-β-D-纤维二糖苷水解生成对硝基苯酚 (PNP), 该物质 (PNP) 在405nm下有最大吸收峰, 进而通过计算得出外切-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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 2 支	4°C保存	临用前甩几下或离心使粉体落入底部, 每支再加 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 22mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 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:

酶标仪、96 孔板、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 (CBH) 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 组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 加入 1mL 经预冷提取液, 冰浴匀浆; 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:

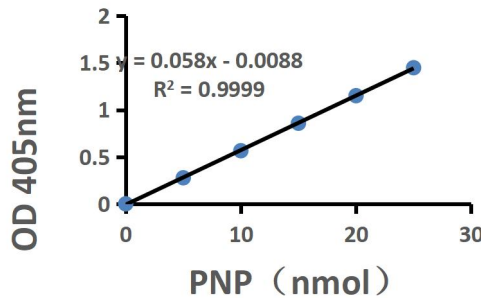
- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。
- ② 试剂一和二可提前于 37 度水浴锅孵育 15-30min。
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一	20	
蒸馏水		20
试剂二	50	50
混匀, 37°C孵育 30min		
试剂三	100	100
混匀, 室温放置 (25°C) 2min, 在 405nm 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】1.若 $\Delta A$  小于 0.01, 可增加样本取样质量  $W$  (如增至 0.2g); 或增加样本加样体积  $V1$  (如由 50 $\mu$ L 增至 100 $\mu$ L, 则试剂二相应减少); 或延长孵育时间  $T$  (如由 30min 增至 60min), 则改变后的  $W$  和  $V1$  和  $T$  需代入计算公式重新计算。
- 2.若 $\Delta A$  大于 1, 可减少样本加样体积  $V1$  (如由 50 $\mu$ L 减至 20 $\mu$ L, 则试剂二相应增加), 或缩短孵育时间  $T$  (如由 30min 减至 10min); 或用蒸馏水稀释样本上清液再加样检测。则改变后的  $V1$  和  $T$  和稀释倍数  $D$  代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算:

- 1、标准曲线方程为  $y = 0.058x - 0.0088$ ;  $x$  为标准品摩尔质量 (nmol),  $y$  为  $\Delta A$ 。



- 2、按照蛋白浓度计算:

定义: 每毫克组织蛋白每小时催化产生 1nmol 对硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力(nmol/h/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0088) \div 0.058] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 689.7 \times (\Delta A + 0.0088) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

- 3、按样本鲜重计算:

定义: 每克组织每小时催化产生 1nmol 对硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力(nmol/h/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0088) \div 0.058] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 689.7 \times (\Delta A + 0.0088) \div W \times D \end{aligned}$$

- 4、按细菌/细胞密度计算:

定义: 每 1 万个细菌或细胞每小时催化产生 1nmol 对硝基苯酚 (PNP) 为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力(nmol/h/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0088) \div 0.058] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 1.4 \times (\Delta A + 0.0088) \times D \end{aligned}$$

- 5、按液体体积计算:

定义: 每毫升液体每小时催化产生 1nmol 对硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力(nmol/h/mL)} &= [(\Delta A + 0.0088) \div 0.058] \div V1 \div T \times D \\ &= 689.7 \times (\Delta A + 0.0088) \times D \end{aligned}$$

$V$ ---加入提取液体积, 1 mL;

$V1$ ---加入样本体积, 0.05 mL;

$T$ ---反应时间, 30 min=1/2 小时;

$W$ ---样本质量, g;

500---细菌或细胞总数, 万;

$D$ ---稀释倍数, 未稀释就是 1;

$Cpr$ ---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 (20 $\mu$ mol/mL): 标准品管甩几下使粉体落入底部, 再加 0.7mL 蒸馏水混匀溶解即 20 $\mu$ mol/mL 的标准品母液。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\mu$ mol/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。