

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-TDX037-96 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 32mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前加 16mL 试剂一，充分混匀呈分散状态，每次用前 务必混匀 ； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- 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 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。
- ③ 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 比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 540nm。
- 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：

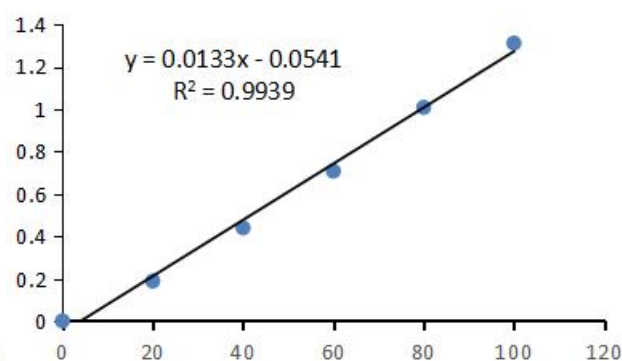
试剂组分（μL）	测定管	对照管
----------	-----	-----

样本	50	50
试剂一		150
试剂二	150	
37°C 孵育 60min		
试剂三	150	150
混匀, 95°C 水浴 5min, 取出后用自来水或冰水冷却至室温, 取 200μL 澄清液体于 96 孔板中, 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 80μL (最多增至 150μL), 则试剂一和二相应减少), 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 $y = 0.0133x - 0.0541$; x 为标准品质量 (μg), y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每小时催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0541) \div 0.0133] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 1503.8 \times (\Delta A + 0.0541) \div W \end{aligned}$$

3、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 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0541) \div 0.0133] \div (Cpr \times V1) \div T \\ &= 1503.8 \times (\Delta A + 0.0541) \div Cpr \end{aligned}$$

4、按液体体积计算:

单位定义: 每毫升液体每小时催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g/min/mL}) &= [(\Delta A + 0.0541) \div 0.0133] \div V1 \div T \\ &= 1503.8 \times (\Delta A + 0.0541) \end{aligned}$$

5、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 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力}(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0541) \div 0.0133] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 3.01 \times (\Delta A + 0.0541) \end{aligned}$$

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, 60 min=1 小时;

W---样本质量, g;

500---细菌或细胞总数, 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 标曲为非必做实验, 用户可根据实验需求制作标曲, 亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算;
- 2 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);
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下:

标品浓度 mg/mL	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品母液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0

各标准管混匀待用。

- 5 依据测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		50
试剂一		150
试剂二	150	
37°C 孵育 60min		
试剂三	150	150
混匀, 95°C 水浴 5min, 取出后用自来水或冰水冷却至室温, 取 200μL 澄清液体于 96 孔板中, 在 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		