

## 内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶/纤维素酶试剂盒说明书

(微板法 96 样)

### 一、产品简介：

内切- $\beta$ -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，这类酶随机水解 $\beta$ -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- $\beta$ -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 110mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 32mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存	临用前加 16mL 试剂一，80°C水浴，搅拌至溶解，仍 4°C保存。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×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、内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶/纤维素酶活性测定：

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°C放置 10min；12000rpm，4°C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°C放置 10min；12000rpm，4°C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°C放置 10min；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 540nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C)，在 EP 管中依次加入：

试剂名称 ( $\mu$ L)	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

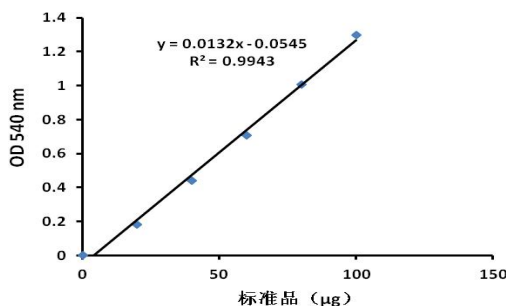
混匀，95℃水浴 5min，取出后用自来水或冰水冷却至室温，取 200μL 澄清液体于 96 孔板中，在 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$  测定管 - A 对照管（每个样本做一个对照管）。

【注】若  $\Delta A$  在零附近如低于 0.005，可增加样本取样质量 W 或增加样本加样体积 V1（如增至 80μL，

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  $y = 0.0132x - 0.0545$ ；x 为标准品质量（μg），y 为  $\Delta A$ 。



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 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶活力}(\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0545) \div 0.0132] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 1515.2 \times (\Delta A + 0.0545) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算

单位定义：每克组织每小时催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶活力}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0545) \div 0.0132] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 1515.2 \times (\Delta A + 0.0545) \div W \end{aligned}$$

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 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶活力}(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0545) \div 0.0132] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 3 \times (\Delta A + 0.0545) \end{aligned}$$

5、按液体体积计算

单位定义：每毫升液体每小时催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶活力}(\mu\text{g/h/mL}) &= [(\Delta A + 0.0545) \div 0.0132] \div V1 \div T \\ &= 1515.2 \times (\Delta A + 0.0545) \end{aligned}$$

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，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℃ 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。