

内切- β -1, 4-葡聚糖酶 (Cx) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

Cx (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，Cx 主要作用于非晶态纤维素和水溶性纤维素衍生物，随机水解糖苷键，将其分解成葡萄糖、纤维二糖、纤维三糖和其他寡聚体。

测定原理：

采用 3,5-二硝基水杨酸法测定 Cx 催化羧甲基纤维素钠降解产生的还原糖的含量。

需自备的仪器和用品：

酶标仪/可见分光光度计、水浴锅、离心机、可调式移液器、96 孔板/微量石英比色皿、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 6mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存；

样品测定的准备：

- 1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 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）；8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 2、组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 3、血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm，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)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	100	
蒸馏水		100

混匀，37℃ 准确水浴 2h

试剂二	200	200
-----	-----	-----

混匀，90℃ 水浴 10min（盖紧，防止水分散失），冷却后，取 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中，测 540nm 下吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

Cx 活性计算:

a. 微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 6.4078x - 0.0673$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

2、血清(浆) Cx 活力的计算

单位的定义: 每 mL 血清(浆) 每分钟催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{Cx 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \end{aligned}$$

3、细胞、细菌和组织中 Cx 活力的计算

(1) 按照蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{Cx 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{Cx 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{Cx 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.0286 \times (\Delta A + 0.0673) \end{aligned}$$

1000: 1mg/mL=1000 μ g/mL; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.11mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 120 min; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

b. 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 3.2039x - 0.0673$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

2、血清(浆) Cx 活力的计算

单位的定义: 每 mL 血清(浆) 每分钟催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{Cx 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 28.61 \times (\Delta A + 0.0673) \end{aligned}$$

3、细胞、细菌和组织中 Cx 活力的计算

(1) 按照蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{Cx 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 28.61 \times (\Delta A + 0.0673) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{Cx 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 28.61 \times (\Delta A + 0.0673) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{Cx 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$=0.057 \times (\Delta A + 0.0673)$$

1000: 1mg/mL=1000ug/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.11mL; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总:
加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 120 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g;
500: 细菌或细胞总数, 500 万。