

Endo- β -1, 4-glucanase/cellulase Activity AssayKit

内切- β -1,4-葡聚糖酶/纤维素酶试剂盒说明书

货号: BN72385 | 方法: 可见分光法 | 规格: 48 样

一、产品简介:

内切- β -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 β -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- 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 33mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存	临用前加 16.5mL 试剂一, 80°C水浴, 搅拌至溶解, 仍 4°C保存。
试剂三	液体 33mL×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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、内切- β -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: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。若是果蔬汁液样本, 按照液体: 纯乙醇=2:8 的比例 (如: 0.4mL 液体加 1.6mL 的纯乙醇混匀, 乙醇占比 80%) 混匀, 4°C放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中再次加入经预冷的 1mL 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、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

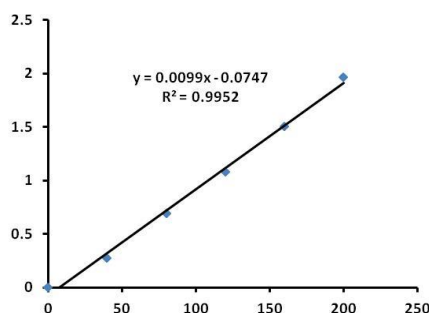
试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一		300
试剂二	300	
37℃孵育 60min		
试剂三	300	300
混匀，95℃水浴 5min，取出后用自来水或冰水冷却至室温，取全部澄清液体于 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，在 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个样本做一个对照管）。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 0.0099x - 0.0747$ ；x 为标准品质量（μg），y 为 ΔA 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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。

$$\text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶}(\mu\text{g/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0747) \div 0.0099] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T$$

$$= 1010.1 \times (\Delta A + 0.0747) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0747) \div 0.0099] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 1010.1 \times (\Delta A + 0.0747) \div W$$

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。

$$\text{内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶}(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0747) \div 0.0099] \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 2 \times (\Delta A + 0.0747)$$

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。

$$\text{直接检测：内切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶}(\mu\text{g/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0747) \div 0.0099] \div V1 \div T$$

$$= 1010.1 \times (\Delta A + 0.0747)$$

乙醇处理：内切-β-1,4-葡聚糖酶/纤维素酶(μg/h/mL)=[(ΔA+0.0747)÷0.0099]÷(V_液×V1÷V)÷T
=1010.1×(ΔA+0.0747)÷V_液

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.1mL； V_液---液体取样体积，mL；

T---反应时间，60 min=1 小时； 500---细菌或细胞总数，万； W---样本质量，g；

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；