

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: BP10295W 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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	粉体 2 支	4℃保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 每支再加 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	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℃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℃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℃×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

2、检测步骤:

- 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:

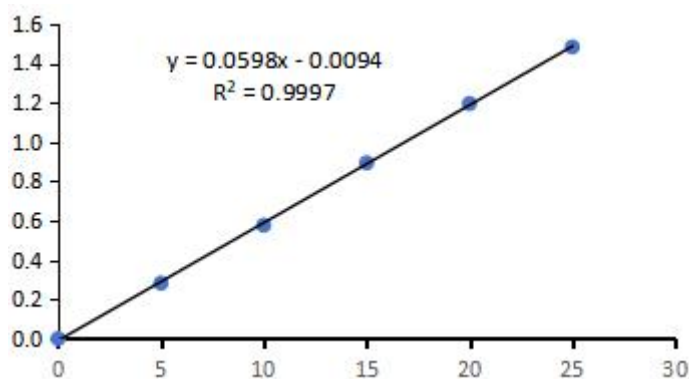
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50

试剂一	20	
蒸馏水		20
试剂二	50	50
混匀，37℃孵育 30min		
试剂三	100	100
混匀，室温放置 (25℃) 2min，在 405nm 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】1.若 ΔA 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 μ L 增至 100 μ 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 ΔA 大于 1，可减少样本加样体积 V1（如由 50 μ L 减至 20 μ 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 $y = 0.0598x - 0.0094$ ；x 为标准品摩尔质量（nmol），y 为 ΔA 。



- 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。

$$\text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力 (nmol/h/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0094) \div 0.0598] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \times D \\ = 668.9 \times (\Delta A + 0.0094) \div \text{Cpr} \times D$$

- 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。

$$\text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力 (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0094) \div 0.0598] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 668.9 \times (\Delta A + 0.0094) \div W \times D$$

- 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。

$$\text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力 (nmol/h/10}^4\text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0094) \div 0.0598] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 1.3 \times (\Delta A + 0.0094) \times D$$

- 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。

$$\text{外切-}\beta\text{-1,4-葡聚糖酶活力 (nmol/h/mL)} = [(\Delta A + 0.0094) \div 0.0598] \div V1 \div T \times D \\ = 668.9 \times (\Delta A + 0.0094) \times D$$

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 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 μ mol/mL 的标准品母液。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 25 μ L，加入 975 μ L 蒸馏水，混匀得到 0.5 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据对照管加样表操作，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。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水	20	70
试剂二	50	50
混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min		
试剂三	100	100
混匀，室温放置 (25 $^{\circ}$ C) 2min，在 405nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		