

内切-β-1, 4-葡聚糖酶 (Cx) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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：

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

试剂的组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 60mL×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	50	50
试剂一	500	
蒸馏水		500

混匀，37℃ 准确水浴 2h

试剂二	1000	1000
-----	------	------

混匀，90℃ 水浴 10min (盖紧，防止水分散失)，冷却后，测 540nm 下吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}}$

-A 对照管。每个测定管需设一个对照管。

Cx 活性计算:

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 $1\mu\text{g}$ 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 $1\mu\text{g}$ 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 $1\mu\text{g}$ 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 $1\mu\text{g}$ 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: $1\text{mg}/\text{mL} = 1000\mu\text{g}/\text{mL}$; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.55mL ; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05mL ; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL ; T : 反应时间, 120min ; 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 。