

内切- $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶 (Cx) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100管/48样

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°C保存；

试剂一：液体6mL×1瓶，4°C保存；

试剂二：液体25mL×1瓶，4°C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<sup>4</sup>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°C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°C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（ $\mu$ L）	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	100	
蒸馏水		100

混匀，37°C准确水浴2h

试剂二	200	200
-----	-----	-----

混匀，90°C水浴10min（盖紧，防止水分散失），冷却后，取200 $\mu$ L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.用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 $\mu$ 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 $\mu$ g葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

（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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ g/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。

b.用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 $\mu$ 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 $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

(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 $\mu$ 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 $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{Cx活力}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.057 \times (\Delta A + 0.0673) \end{aligned}$$

1000: 1mg/mL=1000 $\mu$ g/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。