

## 外切-β-1, 4-葡聚糖酶 (C1) /纤维二糖苷酶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:**

C1 (EC3.2.1.91) 存在于细菌、真菌和动物体内, 是纤维素酶系的组份之一, C1 催化多聚糖链的末端非还原端释放出纤维二糖和葡萄糖。

**测定原理:**

采用 3,5-二硝基水杨酸法测定 C1 催化微晶纤维素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。

**C1 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）C1 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。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \end{aligned}$$

## 3、细胞、细菌和组织中 C1 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。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

### (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 $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \div W \end{aligned}$$

### (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。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.0286 \times (\Delta A + 0.0673) \end{aligned}$$

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）C1 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。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 28.61 \times (\Delta A + 0.0673) \end{aligned}$$

## 3、细胞、细菌和组织中 C1 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。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 28.61 \times (\Delta A + 0.0673) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

### (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 $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 28.61 \times (\Delta A + 0.0673) \div W \end{aligned}$$

### (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。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.057 \times (\Delta A + 0.0673) \end{aligned}$$

1000:  $1\text{mg/mL}=1000\text{ug/mL}$ ; 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。