

## 外切-β-1, 4-葡聚糖酶 (C1) /纤维二糖水解脱酶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：

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：

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 $\Delta A=A$  测定管

-A 对照管。每个测定管需设一个对照管。

### C1 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）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。

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

（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。

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

（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，0.55mL；V 样：加入样本体积，0.05 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。