

纤维素酶(CL)测试盒说明书(精简版)

(货号: A138 CelluLase 50T/24 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂盒组成:

	功能	规格	保存
试剂一	缓冲液	60mL×1 瓶	4~8℃
试剂二	底物液	15mL×1 瓶	4~8℃
试剂三	显色液	10mL×1 瓶	避光 4~8℃
★ 试剂四	2mg/mL 葡萄糖标准液	1mL×1 支	4~8℃

★: 试剂四标准品可直接单点定标计算, 也可作标准曲线(详见附录) 计算糖化液糖含量(糖化液糖含量=(测定 OD-对照 OD)/(标准 OD-空白 OD)×标准品浓度), 代入公式计算。

二、测定原理:

纤维素酶水解纤维素产生的纤维二糖、葡萄糖等还原糖能在碱性条件下的 3,5-二硝基水杨酸(DNS)还原, 生成棕红色的氨基化合物, 在 550nm 波长处有最大光吸收, 在一定范围内还原糖的量与反应液的颜色强度呈比例关系, 利用比色法测定其还原糖生成的量即可测定纤维素酶的活力。

三、测定意义:

纤维素酶(CelluLase)是一种复合酶, 包括外切葡聚糖苷酶(C1 酶)、内切葡聚糖苷酶(CX)酶和 β-葡萄糖苷酶三种主要组分, 可协同作用将纤维素降解为葡萄糖。纤维素酶主要来自于真菌、细菌和动物体内, 其中 C1 酶的作用是将天然纤维素水解成无定形纤维素, CX 酶的作用是将无定形纤维素继续水解成纤维寡糖, β-葡萄糖苷酶的作用是将纤维寡糖水解成葡萄糖。纤维素酶能催化纤维素降解, 还能通过提高植物细胞壁的通透性, 来提供植物细胞内含物的提取率, 是一类可广泛应用于医药、食品、棉纺、环保及可再生资源利用等领域的酶制剂。

四、所需仪器及试剂:

可调 550nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿(或酶标仪及 96 空白), 涡旋混匀器, 离心机, 37℃ 水浴锅, 沸水锅, 秒表, 蒸馏水, 生理盐水或 PBS (0.1M), 蛋白测定试剂(本公司有售)。

五、样本前处理:

① 样本前处理: 取组织称重, 按重量(g): 试剂一(mL) = 1:9 的比例, 加入 9 倍体积的试剂一, 冰水浴匀浆, 4000 转/分钟常温离心 10min, 取匀浆上清一部分待测, 另一部分沸水浴 5min (使酶失活)后取出冷却, 制成煮沸的匀浆上清;

② 细菌或培养细胞:

A: 称重法: 取样时可以先取离心管用万分之一天平称重, 再收集细菌或细胞到离心管内, 1000 转/分钟离心 5min 后弃上清, 再次称重, 减去空离心管重量, 再按 2(mg): 1000(μl) 或 1(mg): 1000(μl) 的比例加入提取液, 超声破碎(冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s、间隔 10s, 重复 30 次), 4000 转/分钟 4℃ 离心 10min, 取匀浆上清一部分待测, 另一部分沸水浴 5min 后取出冷却, 制成煮沸的匀浆上清;

B: 细胞个数法: 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(10⁴ 个): 提取液体积为 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); 4000 转/分钟常温离心 10min, 取匀浆上清一部分待测, 另一部分沸水浴 5min 后取出冷却, 制成煮沸的匀浆上清。

六、操作步骤:

1、酶促反应:

	测定管	对照管
匀浆上清(μL)	50	-
煮沸的匀浆上清(μL)	-	50
试剂一(μL)	50	50
试剂二(μL)	200	200
蒸馏水(μL)	50	50

混匀, 37℃ 孵育 30min 后, 立即取出放入沸水浴中煮沸 15min, 取出流水冷却, 4000 转/分常温离心 10min, 制备糖化液上清。

2、显色反应:

	空白管	标准管	测定管	对照管
糖化液上清(μL)	-	-	50	50
蒸馏水(μL)	50	-	-	-
2mg/mL 葡萄糖标准液(μL)	-	50	-	-
试剂三(μL)	150	150	150	150
混匀, 沸水浴反应 15min, 取出流水冷却				
蒸馏水(μL)	1000	1000	1000	1000
混匀, 波长 550nm, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测定各管 OD 值				

六、单位定义与计算:

①、按蛋白浓度计算:

定义: 每毫克组织蛋白中的纤维素酶每分钟催化纤维素水解产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

计算公式:

$$CL\text{活力} (U/mg\text{prot}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

②、按组织鲜重计算:

定义: 每克组织中的纤维素酶每分钟催化纤维素水解产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

计算公式:

$$CL\text{活力} (U/g\text{组织}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div \left(\frac{V_{\text{样}}}{V_{\text{提}}} \times W \right) \div T$$

③、按细胞密度计算:

定义: 每 1 万细菌或细胞中的纤维素酶每分钟催化纤维素水解产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

计算公式:

$$CL\text{活力} (U/10^4\text{细胞}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div \left(\frac{V_{\text{样}}}{V_{\text{提}}} \times m \right) \div T$$

注: C_{标准} 指显色反应标准液浓度(2000μg/mL);

V_{反应} 指酶促反应体系的总体积(0.35mL);

V_样 指酶促反应样本取样量(0.05mL);

C_{pr} 指组织匀浆蛋白浓度(mgprot/mL, prot 指蛋白);

V_提 指样本前处理时加入的提取液(试剂一)的总体积(mL);

W 指组织鲜重(g);

m 指细胞数量(10⁴ 个);

T 指酶促反应时间(15min)。

八、注意事项:

- 1、本实验可用 1.5mL 离心管进行;
- 2、煮沸时离心管盖上要扎一小孔防止煮沸时盖子弹开;
- 3、如 A 测定-A 对照的值很低(小于 0.02), 可加大匀浆上清量(其它试剂不变), 或延长酶促反应时间(如 60min 等);
- 4、如对照管和测定管 OD 值均较高(大于 1.5), 最好将糖化液上清用蒸馏水稀释后再作显色反应;
- 5、反应完后, 可酶管取 200μL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 550nm 处读数。

附录：标准曲线的制备

1、前处理：

将 2mg/mL (2000 μ g/mL) 葡萄糖标准品用蒸馏水稀释成 400 μ g/mL、800 μ g/mL、1200 μ g/mL、1600 μ g/mL、2000 μ g/mL 几个梯度后，制作标准曲线。

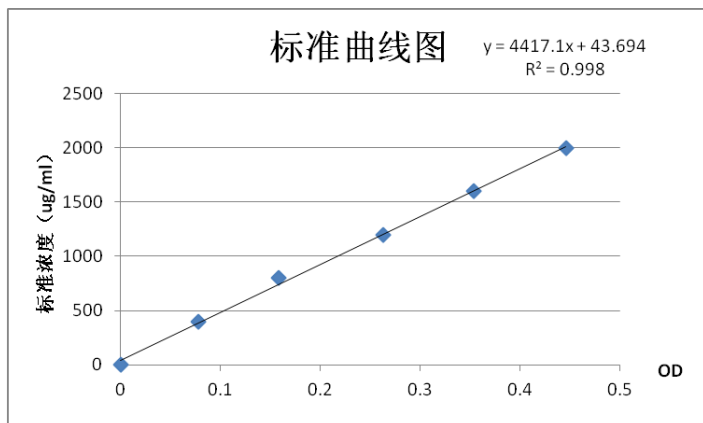
2、操作表：

	空白管	标准管
蒸馏水 (μ L)	50	
不同浓度的葡萄糖标准品 (μ L)		50
试剂三显色剂 (μ L)	150	150
混匀，沸水浴反应 15min，取出流水冷却		
蒸馏水 (μ L)	1000	1000
混匀，波长 550nm，1cm 光径，双蒸水调零，测定各管 OD 值。		

3、测定结果：

标准浓度 (μ g/mL)	测定 OD	绝对 OD
0	0.022	0
400	0.100	0.078
800	0.180	0.158
1200	0.285	0.263
1600	0.376	0.354
2000	0.468	0.446

4、绘图如下：



（标准曲线用户可以不测，用公式计算即可）