

纤维素酶(CL)测试盒说明书

（货号：A138-1-1 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: (试剂盒有效期 6 个月)

	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、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿（或酶标仪（550nm）及 96 孔板），离心机，涡旋混匀器，37℃恒温箱或水浴锅，沸水浴锅，蒸馏水。

三、样本前处理:

① 样本前处理：取组织称重（≤0.1g），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 4℃离心 10min，取匀浆上清待测（匀浆上清可测定其蛋白浓度用于计算，蛋白测定试剂盒本公司有售）；

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）：500（μL）或 1（mg）：250（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，取上清待测；

B：细胞计数法：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（mL）为 500~1000:0.5 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 0.5mL 试剂一），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，4℃离心 10min，取上清待测。

四、操作步骤:（可在离心管中操作）

第 1 步：酶促反应		
	测定管	对照管
匀浆上清（μL）	50	50
试剂一（μL）	50	50
试剂二（μL）	200	200
蒸馏水（μL）	50	50
	混匀，37℃准确反应 30min	混匀，不反应立即进行下一步
立即放入沸水浴中煮沸 15min，取出用自来水冷却至室温，再 4000 转/分，室温离心 10 分钟，得到糖化液上清进行显色反应。		

第 2 步：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
涡旋混匀，置沸水浴中反应 15min，取出用常温水冷却				
蒸馏水（μL）	1000	1000	1000	1000
涡旋混匀，波长 550nm，1cm 光径，双蒸水调零，分光光度计测定各管吸光值 A（或是每管吸出 200μL 反应液，加到 96 孔板中，酶标仪 550nm 处读数）				

注：煮沸时离心管盖上可扎一小孔防止煮沸时盖子弹开；如 A 测定-A 对照的值很低（<0.02），可加大匀浆上清量（其它试剂不变），或延长测定管酶促反应时间（如 60min 等），反之如 A 测定

-A 对照的值较高（>0.5），可将匀浆液稀释或减少测定管酶促反应时间来测定；如对照管和测定管吸光值均较高（>1.0），最好将测定管和对照的糖化液上清均用蒸馏水稀释后再作显色反应，结果乘以稀释倍数。

五、单位定义与计算:

①、按蛋白浓度计算：
定义：每毫克组织（或细胞）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：

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

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：

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

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 还原糖定义为一个酶活力单位。

计算公式：

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

以上公式中：

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, mg/mL;

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(30min)。

六、测定原理:

纤维素酶水解纤维素产生的纤维二糖、葡萄糖等还原糖能将碱性条件下的 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。

七、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。



附录：标准曲线的制备（选做）

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。

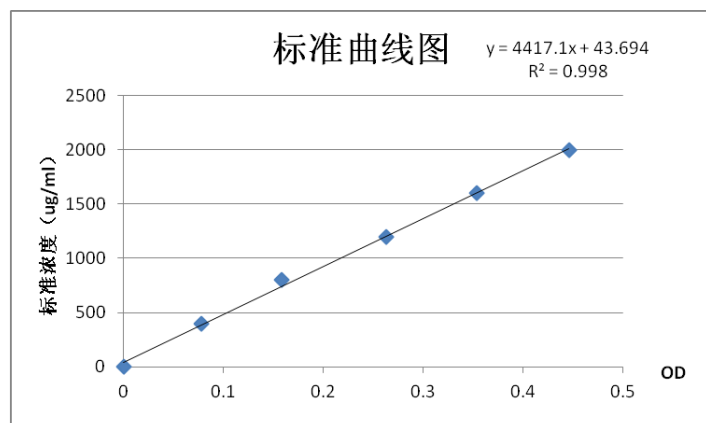
2、操作表：

	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（ μ L）	150	150
涡旋混匀，沸水浴反应 15min，取出用常温水冷却		
蒸馏水（ μ L）	1000	1000
涡旋混匀，波长 550nm，1cm 光径，双蒸水调零，分光光度计测定各管吸光值 A。（或是也用酶标仪读数）		

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画，用公式计算即可。若是需要制作标曲，可将制作的标曲拟合的公式，用样本测定管减去对照管的吸光值差值代入标曲，计算所得值代替前面公式的

$$\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \text{ 部分，继续运算即可得最终结果）}$$