

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0426

Size: 100T/48S

纤维素酶 (CL) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

CL (EC 3.2.1.4) 存在于细菌、真菌和动物体内, 能够催化纤维素降解, 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。

二、测定原理:

采用 3,5-二硝基水杨酸法测定 CL 催化纤维素降解产生的还原糖的含量。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 5mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 20mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 5mL × 1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 × 1 支	4°C 保存	含 10mg 无水葡萄糖 (干燥失重 < 0.2%), 临用前加入 1mL 蒸馏水溶解, 配制成 10mg/mL 葡萄糖溶液备用, 4°C 可保存 1 周, 或者用饱和苯甲酸溶液溶解, 可保存更长时间。

标准品准备: 将标准品用蒸馏水稀释至 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0mg/mL。

五、操作步骤：

● 样品测定的准备：

1、细菌或细胞：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声冰浴破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3S 秒，间隔 10S，重复 30 次）8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。8000g ，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

● 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 ）	对照管	测定管	标准管
试剂一	50	50	-
试剂二	200	200	-
双蒸水	50	50	-
样本		50	-
煮沸的样本	50		-
混匀，40℃准确水浴 30min，取出后立即放入沸水中煮沸 15min，得糖化液			
糖化液	15	15	-
标准液	-	-	15
试剂三	35	35	35
混匀，沸水浴显色 15min（盖紧，防止水分散失）冷却			
双蒸水	250	250	250

混匀，540nm 处蒸馏水调零，测定吸光值 A，样品管计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

标准曲线的建立：540nm 处蒸馏水调零，读标准管吸光值 A。以浓度 (y) 为纵坐标，吸光度 A (x，减浓度为 0 标准管的 OD 值) 为横坐标建立标准曲线。

六、GL 活力计算：

根据标准曲线，将 ΔA 带入公式中 (x) 计算样品浓度 y (mg/mL)。

1、按照蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{GL 活力 (U /mg prot)} = 1000 \times y \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 233 \times y \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{GL 活力 (U/g 鲜重)} = 1000 \times y \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 233 \times y \div W$$

3、按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{GL 活力 (U/10}^4\text{cell)} = 1000 \times y \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.467 \times y$$

1000：单位换算系数，1mg/mL=1000 $\mu\text{g/mL}$ ；V 反总：反应体系总体积，0.35mL；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，30 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。