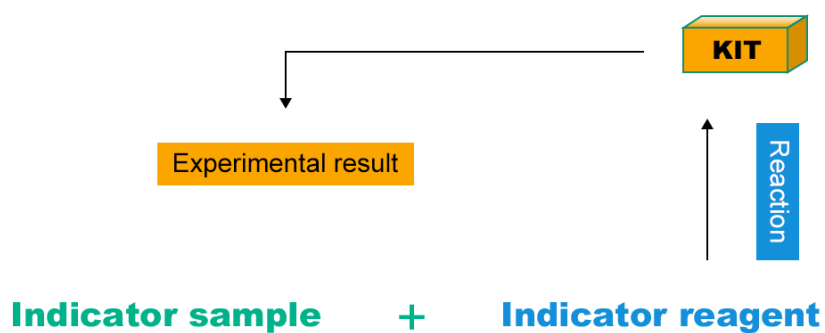


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0989

Size: 100T/48S

内切- β -1, 4-葡聚糖酶 (Cx) 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:

Cx (EC3. 2. 1. 4) 存在于细菌、真菌和动物体内, 是纤维素酶系的组份之一, Cx 主要用于非晶态纤维素和水溶性纤维素衍生物, 随机水解糖苷键, 将其分解成葡萄糖、纤维二糖、纤维三糖和其他寡聚体。

二、测定原理:

采用 3, 5-二硝基水杨酸法测定 Cx 催化羧甲基纤维素钠降解产生的还原糖的含量。

三、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。

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℃保存	
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	

五、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。

六、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 (μ L)	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 200 μ L 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。

七、Cx 活性计算

● 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) Cx 活力的计算

单位的定义: 每 mL 血清 (浆) 每分钟催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

$$= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673)$$

3、细胞、细菌和组织中 C_x 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 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

$$= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \div C_{\text{pr}}$$

(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 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$C_x \text{ 活力 } (\mu\text{g} / \text{min/g 鲜重}) = [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}})$$

$$\div T = 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \div W$$

(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 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

1000: 1mg/mL=1000ug/mL; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.11mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 120 min; C_{pr} : 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。

● 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）Cx 活力的计算

单位的定义：每 mL 血清（浆）每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

3、细胞、细菌和组织中 Cx 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 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

（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 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

（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 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

1000: 1mg/mL=1000ug/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.11mL; V 样: 加入样本体积, 0.01mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; 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。