

纤维素酶(CL)活性检测试剂盒

Cellulase Assay Kit

可见分光光度法

货号: AK196

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES32	50mL×1 瓶	4℃保存
AK196-A	4mL×1 瓶	4℃保存
AK196-B	10mL×1 瓶	4℃保存
AK196-C	13mL×1 瓶	4℃保存
AK196-标准品	粉剂×1 瓶	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 纤维素酶 (cellulase, 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

样品测定的前处理:

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 ES32), 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 ES32), 进行冰浴匀浆。8000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 550nm, 蒸馏水调零。
2. 标准品的准备: 临用前加入 1mL 蒸馏水溶解, 配制成 10mg/mL 标准液备用 (4℃可保存 1 周), 再将标准品用蒸馏水稀释至 5、4、3、2、1、0.5、0 mg/mL。
3. 在 EP 管中依次加入下列试剂

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)	标准管 (ul)
AK196-A	50	50	
AK196-B	200	200	
蒸馏水	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, 另取 EP 管			
糖化液	50	50	
标准液			50
AK196-C	150	150	150

混匀，沸水浴中煮沸显色 15min，冷却			
蒸馏水	1050	1050	1050
混匀，测 550nm 处吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$			

注意：每个测定管需设一个对照管。

CL 活力计算：

标准曲线的建立：以浓度 (y) 为纵坐标，吸光度 A (x, 减去浓度为 0 标准管的 OD 值) 为横坐标建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 带入公式中 (x) 计算浓度 y (mg/mL)。

1. 按照蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL 活力 (U/mg prot)} = 1000 \times y \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 233xy \div \text{Cpr}$$

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 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

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 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

注： 1000: 1mg/mL=1000 μ g/mL; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.35mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 mL; $V_{\text{样总}}$: 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。