

## 内切-β-1, 4-葡聚糖酶 (Cx) 活性测定试剂盒说明书

### 分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 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 主要作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。

#### 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。

#### 需自备的仪器和用品:

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

#### 试剂的组成和配制:

提取液: 液体 50mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 15mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

#### 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。

#### 测定步骤:

- 1、分光光度计预热 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)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一	500	
蒸馏水		500

混匀, 37℃ 准确水浴 2h

试剂二	1000	1000
-----	------	------

混匀, 90℃ 水浴 10min (盖紧, 防止水分散失), 冷却后, 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。

#### Cx 活性计算

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 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

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

### 3、细胞、细菌和组织中 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 $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{Cx 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

#### (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 $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{Cx 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \div W \end{aligned}$$

#### (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 $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

1000: 1mg/mL=1000 $\mu$ g/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.55mL; 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, 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。