



内切-β-1, 4-葡聚糖酶活性检测试剂盒

Cx Assay Kit

微量法

产品编号: AK398M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES398	60mL×1 瓶	4℃保存
AK398-A	6mL×1 瓶	4℃保存
AK398-B	25mL×1 瓶	4℃保存
AK398-标准品	粉剂×1 支	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: 内切-β-1, 4-葡聚糖酶 (endo-β-1,4-glycanase; Cx) (EC3.2.1.4) 存在于细菌、真菌和动物体内, 是纤维素酶系的主要成分, 归结在以前的 Cx 分类中, 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。

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。

自备用品:

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/微量玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

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): ES398 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES398), 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): ES398 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES398), 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. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
2. 标准品准备: 临用前加入 1 mL 蒸馏水溶解成 10mg/ml 的标准品原液备用 (4℃可保存 1 周), 再将标准品用蒸馏水稀释至 0.25、0.2、0.15、0.1、0.05mg/mL。
3. 加样表 (在 EP 管中依次加入下列试剂):

试剂名称	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
样本	10	10		
AK398-A	100			
蒸馏水		100		
混匀, 37℃准确水浴 2h				
AK398-B	200	200	200	
标准品			10	
蒸馏水				10

混匀，90°C水浴 10min（盖紧，防止水分散失），冷却后，测 540nm 下吸光值 A，分别记为 A 测定、A 对照、A 标准、A 空白，计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照， ΔA 标准=A 标准-A 空白。
注：每个测定管需设置一个对照管，空白管和标准曲线只需做 1-2 次。

Cx 活性计算：

1. 绘制标准条件：

根据标准管浓度和吸光度（A 标准管-A 空白管）建立标准曲线，x 为标准品浓度（mg/mL），y 为吸光度。根据标准曲线计算样本中还原糖的含量，即将 ΔA （A 测定管-A 对照管）带入 x 计算出 y 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。

$$\text{Cx 活力 (U/mL)} = [1000 \times X \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T = 91.67 X$$

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 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{Cx 活力 (U/mg prot)} = [1000 \times X \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 91.67 X \div \text{Cpr}$$

（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。

$$\text{Cx 活力 (U/g 鲜重)} = [1000 \times X \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 91.67 X \div W$$

（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。

$$\text{Cx 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [1000 \times X \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.183 X$$

注：1000：1mg/mL=1000 μ g/mL；V 反总：反应体系总体积，0.11mL；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入 ES398 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。

注意事项：

如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。