



外切-β-1, 4-葡聚糖酶活性检测试剂盒

C1 Assay Kit

分光光度法

产品编号: AK399V

产品规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES399	30mL×1 瓶	4℃保存;
AK399-A	15mL×1 瓶	4℃保存;
AK399-B	70mL×1 瓶	4℃保存;
AK399-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: 外切-β-1, 4-葡聚糖酶 / 纤维二糖苷酶 (C1) (EC3.2.1.91) 存在于细菌、真菌和动物体内, 是纤维素酶系的组分之一, C1催化多聚糖链的末端非还原端释放出纤维二糖和葡萄糖。

原理: 采用 3,5-二硝基水杨酸法测定 C1 催化微晶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、离心机、可调式移液器、1mL 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): ES399 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES399), 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): ES399 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES399), 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. 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	50	50		
AK399-A	500			
蒸馏水		500		
混匀, 37℃准确水浴 2h				
AK399-B	1000	1000	1000	
标准品			50	
蒸馏水				50
混匀, 90℃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。

C1 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) C1 活力的计算

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

$$\text{C1 活力 (U/mL)} = [1000 \times X \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 91.67 X$$

3. 细胞、细菌和组织中 C1 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 $1\mu\text{g}$ 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{C1 活力 (U/mg prot)} = [1000 \times X \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 91.67 X \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 $1\mu\text{g}$ 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{C1 活力 (U/g 鲜重)} = [1000 \times X \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 91.67 X \div W$$

(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 $1\mu\text{g}$ 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{C1 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [1000 \times X \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.183 X$$

注: 1000: $1\text{mg/mL} = 1000\mu\text{g/mL}$; 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 ES399 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。