

纤维素酶 (cellulase, CL) / 羧甲基纤维素酶活性测定

试剂盒说明书

微量法 100 管/48 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:

CL (EC 3.2.1.4) 存在于细菌、真菌和动物体内, 能够催化羧甲基纤维素降解, 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。

测定原理:

采用蒽酮比色法测定 CL 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/酶标仪、水浴锅、移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、浓硫酸和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

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 40mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 5mL 蒸馏水和 45mL 浓硫酸充分溶解待用。

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 (10⁴ 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。

加样表和测定步骤:

试剂名称	对照管	测定管
样本	50	50
试剂一 (μL)		90
试剂二 (μL)	370	370
蒸馏水 (μL)	180	90

37℃ 振荡反应 1h 后, 90℃ 水浴 15min (盖紧, 防止水分散失), 冷却后

8000g 25℃ 离心 10min, 取上清, 得糖化液

糖化液 (μL)	140	140
试剂三 (μL)	260	260

混匀, 90℃ 水浴 10min (盖紧, 防止水分散失), 冷却, 取 200 μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 测 620nm 下吸光值 A, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个

订购热线: 400-990-7709

传真: 021-57690166

http://www.affandi-e.com1

上海抚生实业有限公司

联系电话: 400-990-7709, 021-52961052, 021-52961053

对照管。

CL 活力计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定的回归方程为 $y = 5.018x - 0.0462$ ； x 为标准品浓度 (mg/mL)， y 为吸光值。

2、血清（浆）CL 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。

CL 活力(μ g /min/mL) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 5.018 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 39.8 \times (\Delta A + 0.0462)$

3、细胞、细菌和组织中 CL 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。

CL 活力(μ g /min/mg prot) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 5.018 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T$
 $= 39.8 \times (\Delta A + 0.0462) \div Cpr$

(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。

CL 活力(μ g /min /g 鲜重) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 5.018 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$
 $= 39.8 \times (\Delta A + 0.0462) \div W$

(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。

CL 活力(μ g /min / 10^4 cell) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 5.018 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$
 $= 0.0796 \times (\Delta A + 0.0462)$

1000: 1mg/mL=1000 μ g/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.6mL; 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, 60 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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件测定回归方程为 $y = 2.5090x - 0.0462$ ； x 为标准品浓度 (mg/mL)， y 为吸光值。

2、血清（浆）CL 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。

CL 活力(μ g /min/mL) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 2.509 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 79.6 \times (\Delta A + 0.0462)$

3、细胞、细菌和组织中 CL 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。

CL 活力(μ g /min /mg prot) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 2.509 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T$
 $= 79.6 \times (\Delta A + 0.0462) \div Cpr$

(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。

CL 活力(μ g /min /g 鲜重) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 2.509 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$
 $= 79.6 \times (\Delta A + 0.0462) \div W$

(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。

CL 活力(μ g /min / 10^4 cell) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 2.509 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$$=0.1592 \times (\Delta A + 0.0462)$$

1000: 1mg/mL=1000ug/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.6mL; 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, 60 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。

上海抚生实业有限公司
<http://www.affandi-e.com>