

使用说明书

Instruction Manual

内切- β -1, 4-葡聚糖酶活性检测试剂盒（微量法）

Cx Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0061M-ES	60mL×1 瓶	4℃保存
CB0061M-A	6mL×1 瓶	4℃保存
CB0061M-B	15mL×1 瓶	4℃保存
CB0061M-Standard	粉剂×1 支	4℃保存

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、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。

二、样品测定的准备：

- 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）：CB0061M-ES 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL CB0061M-ES），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。
- 组织：按照组织质量（g）：CB0061M-ES 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0061M-ES），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 血清（浆）样品：直接检测。

三、测定步骤：

- 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。
- 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。
- 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		
CB0061M-A	100			
蒸馏水		100		
混匀, 37°C准确水浴 2h。				
CB0061M-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 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$, $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。				

注: 每个测定管需设一个对照管, 空白管和标准曲线只需做 1-2 次。

四、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 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

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 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

(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 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

注: 1000: 1mg/mL=1000ug/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 CB0061M-ES 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

1. 每个测定管需设一个对照管。
2. 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。
3. 蛋白定量测定, 建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

