

纤维素酶（CL）活性检测试剂盒（可见分光光度法）

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定。

产品货号：BA1427

产品规格：50管/24样

产品内容：

提取液：液体50mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体4mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体10mL×1瓶，4℃保存；

试剂三：液体13mL×1瓶，4℃保存；

标准品：粉剂×1支，4℃保存，含10mg无水葡萄糖（干燥失重<0.2%），临用前加入1mL蒸馏水溶解，配制成10mg/mL葡萄糖溶液备用，4℃可保存1周，或者用饱和苯甲酸溶液溶解，可保存更长时间。

标准品准备：将标准品用蒸馏水稀释至 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0mg/mL。

产品说明：

CL（EC 3.2.1.4）存在于细菌、真菌和动物体内，能够催化纤维素降解，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。采用3,5-二硝基水杨酸法测定CL催化纤维素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、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样品测定的准备：

1、细菌或细胞：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每500万细菌或细胞加入1mL提取液，超声冰浴破碎细菌或细胞（功率20%，超声3S秒，间隔10S，重复30次）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：称取约0.1g组织加入1mL提取液，冰浴中匀浆。8000g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

二、加样表和测定步骤：

试剂名称（uL）	对照管	测定管	标准管
试剂一	50	50	-
试剂二	200	200	-
双蒸水	50	50	-
样本		50	-
煮沸的样本	50		-
混匀，40℃准确水浴30min，取出后立即放入沸水中煮沸15min，得糖化液			
糖化液	50	50	-
标准液	-	-	50
试剂三	150	150	150
混匀，沸水浴中煮沸显色15min，冷却			
双蒸水	1050	1050	1050

混匀，540nm处蒸馏水调零，测定吸光值A，样品管计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

标准曲线的建立：540nm处以标准管0mg/mL调零，读标准管吸光值A。以浓度（y）为纵坐标，吸光度 A（x）为横坐标建立标准曲线。

CL 活力计算：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

根据标准曲线，将 ΔA 带入公式中 (x) 计算样品浓度 y (mg/mL)。

1、按照蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生1 μ g葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL活力 (U/mg prot)} = 1000 \times y \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 233 \times y \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟催化产生1 μ g葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL活力 (U/g 鲜重)} = 1000 \times y \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 233 \times y \div W$$

3、按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化产生1 μ g葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = 1000 \times y \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.467 \times y$$

1000: 1mg/mL=1000 μ g/mL; V反总: 反应体系总体积, 0.35mL; 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, 30min; 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。

ADH 测定操作:

1. 分光光度计预热30 min, 调节波长到340 nm, 蒸馏水调零。

2. 试剂二在25 $^{\circ}$ C水浴中保温30 min。

3. 空白管: 在1mL石英比色皿中依次加入100 μ L蒸馏水、800 μ L试剂二和100 μ L试剂四, 迅速混匀后于340nm测定吸光值变化, 分别记录15s和75s时吸光值, 分别记为A1和A2。 ΔA 空白管=A1-A2。

4. 测定管: 在1mL石英比色皿中依次加入100 μ L上清液、800 μ L试剂二和100 μ L试剂四, 迅速混匀后于340nm测定吸光值变化, 分别记录15s和75s时吸光值, 分别记为A3和A4。 ΔA 测定管=A3-A4。

注意: 空白管只需测定一次。

计算公式:

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义: 25 $^{\circ}$ C中每毫克蛋白每分钟氧化 1 μ mol NADH 为1个酶活单位。

$$\text{ADH } (\mu\text{mol/min/mg prot}) = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义: 25 $^{\circ}$ C中每克组织每分钟氧化 1 μ mol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH } (\mu\text{mol/min/g}) = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义: 25 $^{\circ}$ C中每10⁴个细胞每分钟氧化 1 μ mol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH } (\mu\text{mol/min/10}^4 \text{ cell}) = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义: 25 $^{\circ}$ C中每毫升血清每分钟氧化1 μ mol NADH为1个酶活单位。

$$\text{ADH } (\mu\text{mol/min/mL}) = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div V_{\text{样}} \div T = 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}})$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1 cm; V反总: 反应体系总体积, 1000 μ L=0.001 L; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V样: 加入 反应体系中上清液体积, 100 μ L=0.1 mL; T: 反应时间, 1min。

注意事项:

1. 上清液蛋白质浓度需要另外测定, 建议使用本公司BCA蛋白质含量测定试剂盒。
2. 配制好的试剂二3天使用完。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com