内切-β-1，4-葡聚糖酶（Cx）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

Cx（EC3.2.1.4）存在于细菌、真菌和动物体内，是纤维素酶系的组份之一，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。

测定原理：

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。

试剂组成和配制：

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 25mL×1 瓶，4℃保存；

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）：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。

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、加样表（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	100	
蒸馏水		100

混匀，37℃准确水浴 2h

试剂二	200	200

混匀， 90℃水浴 10min（盖紧，防止水分散失），冷却后，取 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中，测 540nm 下吸光值 A，计算ΔA=A 测定管-A 对照管。每个测定管需设一个对照管。

Cx 活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 y = 6.4078x - 0.0673；x 为标准品浓度（mg/mL），y 为吸光值。

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 活力(μg /min/mL)= [1000×(ΔA+0.0673) ÷6.4078×V 反总]÷V 样÷T

=14.305×(ΔA+0.0673)

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 活力(μg /min/mg prot)=[[1000×(ΔA+0.0673) ÷6.4078×V 反总]÷(V 样×Cpr) ÷T

=14.305×(ΔA+0.0673) ÷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 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

Cx 活力(μg /min /g 鲜重)=[1000×(ΔA+0.0673) ÷6.4078×V 反总]÷(W× V 样÷V 样总) ÷T

=14.305×(ΔA+0.0673) ÷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 活力(μg /min /10^4 cell)=[1000×(ΔA+0.0673) ÷6.4078×V 反总]÷(500×V 样÷V 样总) ÷T

=0.0286×(ΔA+0.0673)

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：加入提取液体积，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。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 y = 3.2039x - 0.0673；x 为标准品浓度（mg/mL），y 为吸光值。

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 活力(μg /min/mL)= [1000×(ΔA+0.0673) ÷3.2039×V 反总]÷V 样÷T

=28.61×(ΔA+0.0673)

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 活力(μg /min/mg prot)=[[1000×(ΔA+0.0673) ÷3.2039×V 反总]÷(V 样×Cpr) ÷T

=28.61×(ΔA+0.0673) ÷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 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

Cx 活力(μg /min /g 鲜重)=[1000×(ΔA+0.0673) ÷3.2039×V 反总]÷(W× V 样÷V 样总) ÷T

=28.61×(ΔA+0.0673) ÷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 活力(μg /min /10^4 cell)=[1000×(ΔA+0.0673) ÷3.2039×V 反总]÷(500×V 样÷V 样总) ÷T

$=0.057\times(\Delta A+0.0673)$

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：加入提取液体积，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。