

外切-β-1, 4-葡聚糖酶 (C1) 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：

C1 (EC3.2.1.91) 存在于细菌、真菌和动物体内，是纤维素酶系的组份之一，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。

测定原理：

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。

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：

- 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。
- 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。
- 血清 (浆) 样品：**直接检测。

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。
- 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 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

C1 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

$$y = 6.4078x - 0.0673; \quad x \text{ 为标准品浓度 (mg/mL), } y \text{ 为吸光值。}$$

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 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \end{aligned}$$

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 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 14.305 \times (\Delta A + 0.0673) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 6.4078 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.0286 \times (\Delta A + 0.0673) \end{aligned}$$

1000: 1mg/mL=1000 μ g/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）C1 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。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 28.61 \times (\Delta A + 0.0673) \end{aligned}$$

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 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 28.61 \times (\Delta A + 0.0673) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 28.61 \times (\Delta A + 0.0673) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{C1 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.0673) \div 3.2039 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.057 \times (\Delta A + 0.0673) \end{aligned}$$

1000: 1mg/mL=1000 μ g/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。