

# 纤维素酶（CL）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10462

规格：100T/48S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制：

标准品：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°C可保存 1 周，或者用饱和苯甲酸溶液溶解，可保存更长时间。

**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。

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

**操作步骤：****一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

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 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次）；8000g 4°C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°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

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

3、加样表（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称（ $\mu$ L）	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°C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	15	15	-
标准液	-	-	15
试剂三	35	35	35
混匀, 沸水浴显色 15min (盖紧, 防止水分散失), 冷却			
双蒸水	250	250	250
混匀, 540nm 处蒸馏水调零, 测定吸光值 A, 样本管计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。			

### 三、CL活力计算

#### 1、标准曲线的建立:

540nm 处蒸馏水调零, 读标准管吸光值 A。以浓度 (y) 为纵坐标, 吸光度 A (x, 减浓度为 0 标准管的 OD 值) 为横坐标建立标准曲线。根据标准曲线, 将  $\Delta A$  带入公式中 (x) 计算浓度 y (mg/mL)。

#### 2、按样本蛋白浓度计算

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 $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

#### 3、按样本质量计算

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

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

#### 4、按细菌或细胞数量计算

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 $\mu$ 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: 单位换算系数, 1mg/mL=1000 $\mu$ 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, 30 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。

#### 相关发表文献:

Guo Q, Du G, Qi H, et al. A nematocidal tannin from Punica granatum L. rind and its physiological effect on pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*)[J]. Pesticide biochemistry and physiology, 2017, 135: 64-68.

#### 参考文献:

Faria M L, Kolling D, Camassola M, et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates[J]. Biores. Technol, 2008, 99: 1417-1424.