

纤维素酶（cellulase, CL）/羧甲基纤维素酶活性测定

试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

CL (EC 3.2.1.4) 存在于细菌、真菌和动物体内，能够催化羧甲基纤维素降解，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。

测定原理：

采用蒽酮比色法测定CL催化羧甲基纤维素钠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/酶标仪、水浴锅、移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、浓硫酸和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

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 40mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃保存； 临用前加入 5mL 蒸馏水和 45mL 浓硫酸充分溶解待用。

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。

加样表和测定步骤：

| 试剂名称 | 对照管 | 测定管 |
|----------------------|-----|-----|
| 样本 | 50 | 50 |
| 试剂一（ μL ） | | 90 |
| 试剂二（ μL ） | 370 | 370 |
| 蒸馏水（ μL ） | 180 | 90 |

37℃振荡反应 1h 后，90℃水浴 15min（盖紧，防止水分散失），冷却后

8000g 25℃离心 10min, 取上清, 得糖化液

| | | |
|----------|-----|-----|
| 糖化液 (μL) | 140 | 140 |
| 试剂三 (μL) | 260 | 260 |

混匀, 90℃水浴 10min (盖紧, 防止水分散失), 冷却, 取 200 μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 测 620nm 下吸光值 A, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个对照管。

CL 活力计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定的回归方程为 $y = 5.018x - 0.0462$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

2、血清 (浆) CL 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。

CL 活力(μg /min/mL) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 5.018 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 39.8 \times (\Delta A + 0.0462)$

3、细胞、细菌和组织中 CL 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。

CL 活力(μg /min/mg prot) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 5.018 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$
 $= 39.8 \times (\Delta A + 0.0462) \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本鲜重计算

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

CL 活力(μg /min /g 鲜重) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 5.018 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$
 $= 39.8 \times (\Delta A + 0.0462) \div W$

(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 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

CL 活力(μg /min /10⁴ cell) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 5.018 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$
 $= 0.0796 \times (\Delta A + 0.0462)$

1000: 1mg/mL=1000ug/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.6mL; 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, 60 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、标准条件测定回归方程为 $y = 2.5090x - 0.0462$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

2、血清 (浆) CL 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。

CL 活力(μg /min/mL) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 2.509 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 79.6 \times (\Delta A + 0.0462)$

3、细胞、细菌和组织中 CL 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 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

CL 活力(μg /min /mg prot) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 2.509 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$
 $= 79.6 \times (\Delta A + 0.0462) \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本鲜重计算

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

CL 活力(μg /min /g 鲜重) = $[1000 \times (\Delta A + 0.0462) \div 2.509 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$
 $= 79.6 \times (\Delta A + 0.0462) \div W$

(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 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{CL 活力}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4\text{cell})=[1000\times(\Delta A+0.0462)\div 2.509\times V_{\text{反总}}]\div(500\times V_{\text{样}}\div V_{\text{样总}})\div T$$
$$=0.1592\times(\Delta A+0.0462)$$

1000: 1mg/mL=1000 μ g/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.6mL; 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, 60 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。