

纤维二糖水解酶（CBH）活性检测试剂盒说明书

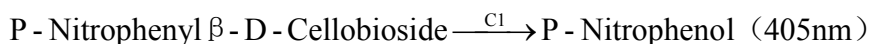
产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHD9-C24	纤维二糖水解酶（CBH）活性检测试剂	24T	常量法
AMHD9-C48	盒说明书	48T	

一、测定意义：

纤维二糖水解酶（CBH）存在于细菌、真菌和动物体内，是微生物纤维素降解酶系的主要组分，也是水解天然纤维素的必需组分。

二、测定原理：

CBH 酶作用于纤维素线状分子的末端，水解 β -葡萄糖苷键，每次切下 1 个纤维二糖分子。CBH 能够催化对硝基苯纤维二糖苷（PNPC）生成对硝基苯酚，后者在 405 nm 有特征光吸收。



三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 120mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
	试剂二配制：用时每瓶粉剂加入试剂一 6mL，混匀充分溶解。		
试剂三	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	4℃保存
标准品 (1mg/mL)	液体 1mL×1 支	液体 1mL×2 支	4℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）：提取液（mL）为1:10的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。

测定步骤

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。
2. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 将1mg/mL标准品用蒸馏水依次稀释至0、10、20、40、60、80、100 μ g/mL，备用；
4. 操作表：

	测定管	对照管	空白管	标准管
样品 (μL)	500	500	-	-
蒸馏水	-	-	500	
标准品 (μL)	-	-	-	500
试剂一 (μL)	400	400	400	400
试剂二 (μL)	100	-	100	100
混匀, 37℃孵育 30min。				
试剂三 (μL)	500	500	500	500
试剂二 (μL)	-	100	-	-
混匀, 静置 3min, 取 230 μL 至酶标板/96 孔板, 于波长 405nm 酶标仪测定各管吸光度。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$				

四、纤维二糖水解酶(CBH)活性计算:

1、标准曲线绘制: 以吸光度值为横坐标, 标准品浓度为纵坐标, 绘制标准曲线 $y = kx + b$, x 为吸光度值, y 为标准品浓度 (μg/mL)。根据标准曲线, 将 A 带入公式计算出样本浓度 (y , μg/mL);

2、样本纤维二糖水解酶含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 μg 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式: 纤维二糖水解酶 (U/mg prot) = $y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每克组织催化产生 1 μg 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式: 纤维二糖水解酶 (U/g) = $y \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

五、 注意事项:

1、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;

2、试剂二需要密封避光保存。