

纤维二糖水解酶（CBH）活性检测试剂盒说明书

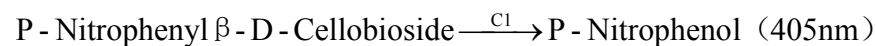
| 产品货号 | 产品名称 | 包装规格 | 测定方法 |
|-----------|--------------------|------|------|
| AMHD9-M48 | 纤维二糖水解酶（CBH）活性检测试剂 | 48T | 微量法 |
| AMHD9-M96 | 盒说明书 | 96T | |

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(48T) | 试剂装量(96T) | 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 15mL×1 瓶 | 液体 30mL×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 3mL，混匀充分溶解。 | | |
| 试剂三 | 液体 15mL×1 瓶 | 液体 30mL×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) | 10 | 10 | - | - |
| 蒸馏水 | - | - | 10 | |
| 标准品 (μL) | - | - | - | 10 |
| 试剂一 (μL) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 试剂二 (μL) | 20 | - | 20 | 20 |
| 混匀, 37℃ 孵育 15min | | | | |
| 试剂三 (μL) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 试剂二 (μL) | - | 20 | - | - |
| 混匀, 静置 3min, 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。