

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K1217-M

产品规格: 48T(16 samples)/96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(500-510 nm)

Elabscience®纤维素酶(CL)比色法测试盒

Cellulase (CL) Activity Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测土壤、组织、细菌、菌液上清和其他液体中的纤维素酶(CL)活力。

检测原理

纤维素酶(CL)分解底物产生还原糖，在酶的作用下，与色原生成有色物质，通过 505nm 处吸光度的大小来测定 CL 的活力。

本试剂盒检测组织样本时，可能需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size 1)(48 T)	规格 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	底物 (Substrate)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酚溶液 (Phenol Solution)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶溶液 (Enzyme Solution)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	50 mmol/L 葡萄糖标准品 (50 mmol/L Glucose Standard)	1.2 mL×1 支	1.2 mL×1 支	2-8°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	提取液 (Extracting Solution)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同试剂盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(500-510 nm, 最适检测波长 505 nm)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25°C。

② 酶工作液的配制：

按试剂二：试剂三=1:1的体积比混匀，现配现用，2-8°C避光保存24 h。

③ 2 mmol/L标准品的配制：

取40 μL 试剂四，加入960 μL 超纯水，充分混匀，配制成2 mmol/L标准品溶液，2-8°C避光保存24 h。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	2
2 mmol/L 标准品(μL)	0	25	50	75	100	125	150	200
超纯水(μL)	200	175	150	125	100	75	50	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：称取 0.1 g 按照组织质量(g)：试剂五体积(mL)为 1:9 的比例，加入 0.9 mL 试剂五，4°C 条件下，机械匀浆。4°C，12000 × g 离心 10 min，取上清，置于冰盒中待用。

细菌样本：将收集到的细菌按照 1000 × g 离心 10 min，弃去上清。按照每 500×10^4 个细菌加入 0.9 mL 试剂五。超声冰浴破碎细菌 (200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次)。4°C 条件下，12000 × g 离心 10 min，取上清，置于冰盒中待用。

土壤样本：新鲜土壤样本自然风干或 37°C 烘箱风干，过 30~50 目筛。按照土壤质量(g)：试剂五体积(mL)为 1:9 的比例，每 0.1 g 土壤样本加入 0.9 mL 试剂五，4°C 条件下，进行机械匀浆。4°C，12000 × g 离心 10 min，取上清，置于冰盒中待用。

菌液上清或其他液体样本：可以直接检测。

对照样本的制备：将处理得到的样本取一部分进行酶的灭活处理，放入沸水中煮沸 15 min，待冷却后(可以冷水流加速冷却)得对照样本。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，不同样本的稀释如下表(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
土壤样本	不稀释	腐败植物组织	1-10
菌液	不稀释		

注：稀释液为试剂五。

实验关键点

- ① 试剂一略微粘稠，请缓慢吸取，确保体积准确。
- ② 水浴过程中可能造成体积损失，请确保密封良好。
- ③ 对照样本需要对样本进行煮沸处理，请在实验前计算好样本使用量。
- ④ 若沸水浴过程中，测定、对照管有液体损失，请补加超纯水至 200 μL 。
- ⑤ 煮沸过程中可能会有物质析出，12000 \times g 离心 10 min，取上清待用。

操作步骤

- ① 测定管：取一个 0.5 mL EP 管，加入 160 μL 试剂一，再加入 40 μL 待测样本。
对照管：取一个 0.5 mL EP 管，加入 160 μL 试剂一，再加入 40 μL 对照样本(煮沸处理过的待测样本)。
- ② 充分混匀后，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h。孵育结束后，将上述 EP 管放入沸水中煮沸 15 min，待冷却后得糖化液，取糖化液加入酶标板孔中。
- ③ 测定孔：取②中测定管处理得到的糖化液 50 μL 加入到测定孔中。
对照孔：取②中对照管处理得到的糖化液 50 μL 加入到对照孔中。
标准孔：取不同浓度标准品 50 μL 加入到标准孔中。
- ④ 向③中各孔加入 200 μL 酶工作液，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min，在酶标仪 505 nm 处测各孔 OD 值。

操作表

	标准管	测定管	对照管
试剂一(μL)	--	160	160
样本(μL)	--	40	--
对照样本(μL)	--	--	40
充分混匀后, 50°C 水浴 1 h。孵育结束后, 将上述 EP 管放入沸水中煮沸 15 min, 待冷却后得糖化液, 取糖化液加入酶标板孔中。			
糖化液(μL)	--	50	50
不同浓度标准品	50	--	--
酶工作液(μL)	200	200	200
37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 在酶标仪 505 nm 处测各孔 OD 值。			

备注: 若煮沸后有物质析出, $12000 \times \text{g}$ 离心 10 min, 取上清加入到酶标板中。
若沸水浴过程中, 测定、对照管有液体损失, 请补加超纯水至 200 μL 。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

1. 液体样本计算:

定义: 50°C条件下每毫升液体样本每分钟催化生成 1 μg 葡萄糖定义为 1 个酶活单位, 单位为 U/mL。

$$\text{纤维素酶活力 (U/mL)} = \frac{(\Delta A - b) \div a \times V_3 \times f \times 180.16^*}{T \times V_2 \div V_1} = (\Delta A - b) \div a \times f \times 15.01$$

2. 组织质量计算:

定义: 50°C条件下每克样本每分钟催化生成 1 μg 葡萄糖定义为 1 个酶活单位, 单位为 U/g。

$$\text{纤维素酶活力 (U/g)} = \frac{(\Delta A - b) \div a \times V_3 \times f \times 180.16^*}{T \times m \times V_2 \div V_1} = (\Delta A - b) \div a \div m \times f \times 15.01$$

3. 蛋白浓度计算:

定义: 50°C条件下每毫克蛋白每分钟催化生成 1 μg 葡萄糖定义为 1 个酶活单位, 单位为 U/gprot。

$$\text{纤维素酶活力 (U/gprot)} = \frac{(\Delta A - b) \div a \times V_3 \times f \times 180.16^*}{T \times C_{\text{pr}} \times V_2} = (\Delta A - b) \div a \div C_{\text{pr}} \times f \times 15.01$$

4. 细菌数量计算:

定义: 50°C条件下每 10^4 个细菌每分钟催化生成 1 μg 葡萄糖定义为 1 个酶活单位, 单位为 U/ 10^4 。

$$\text{纤维素酶活力 (U/10^4)} = \frac{(\Delta A - b) \div a \times V_3 \times f \times 180.16^*}{T \times N \times V_2 \div V_1} = (\Delta A - b) \div a \div N \times f \times 15.01$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品浓度, mmol/L

a: 标曲斜率

b: 标曲截距

ΔA : 测定管 OD 值-对照管 OD 值

V_1 : 样本体积, 建议取 1 mL, 单位为 mL

V_2 : 上样体积, 建议取 0.04 mL, 单位为 mL

V_3 : 反应体系总体积, 建议取 0.2 mL, 单位为 mL

m : 称取样本的质量, 建议取 0.1 g, 单位为 g

C_{pr} : 样本蛋白质浓度, 单位为 mg/mL

N : 细菌总数 $N \times 10^4$, 建议 N 取 500, 即 500×10^4

f : 样本稀释倍数

T : 酶促反应时间 60 min

180.16*: 葡萄糖微摩尔质量 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$

附录1 关键数据

1. 技术参数

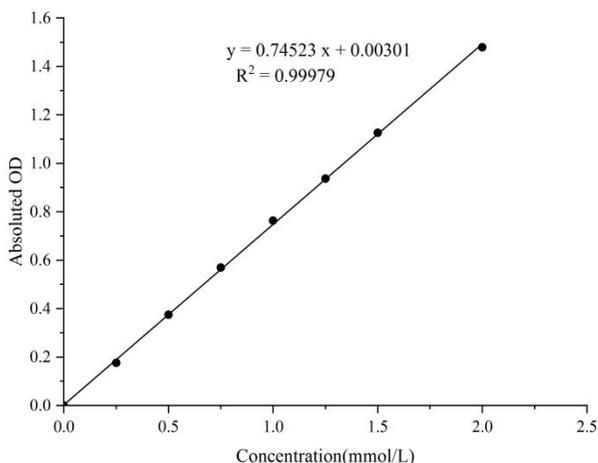
检测范围	0.92-300 U/g	批间差	4.5-5.3%
灵敏度	0.92 U/g	批内差	3.5-4.9%
回收率	98-103%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量50 μ L, 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	2
OD 值	0.043	0.218	0.418	0.607	0.814	0.984	1.178	1.529
	0.043	0.22	0.418	0.619	0.8	0.975	1.16	1.515
平均 OD 值	0.043	0.219	0.418	0.613	0.807	0.980	1.169	1.522
绝对 OD 值	0.000	0.176	0.375	0.570	0.764	0.937	1.126	1.479

② 绘制标曲(如下图):



附录2 实例分析

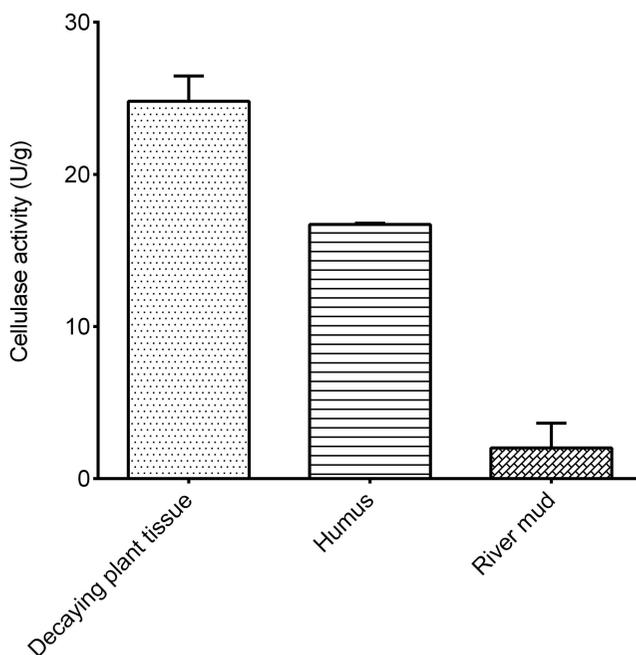
例如检测腐败植物组织(数据仅供参考):

取200 μL 10%腐败植物组织,按说明书操作,分别取40 μL 待测样本与对照样本进行检测。

标准曲线: $y = 0.74523x + 0.00301$, 测定孔OD值为0.240, 对照孔OD值为0.115, 按样本质量计算, 计算结果为:

$$\begin{aligned}\text{纤维素酶活力(U/g)} &= (0.240 - 0.115 - 0.00301) \div 0.74523 \div 0.1 \times 1 \times 15.01 \\ &= 24.57 \text{ U/g}\end{aligned}$$

按照说明书操作,测定10%腐败植物组织(稀释10倍,加样量40 μL)、10%腐殖土样本(稀释10倍,加样量40 μL)、10%河泥样本(稀释10倍,加样量40 μL)。(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
	稀释倍数太大	调整稀释倍数
测不出值	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
	杂质较多	调整稀释倍数
复孔差大	水浴过程体积损失	确保容器密封
		补加相应体积超纯水
	未充分混匀	充分混匀

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

