

(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 | | 1 板 | |
| | 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, $12000 \times g$ 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。

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

4. 细菌数量计算：

定义：50°C 条件下每 10⁴ 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/10⁴。

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

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

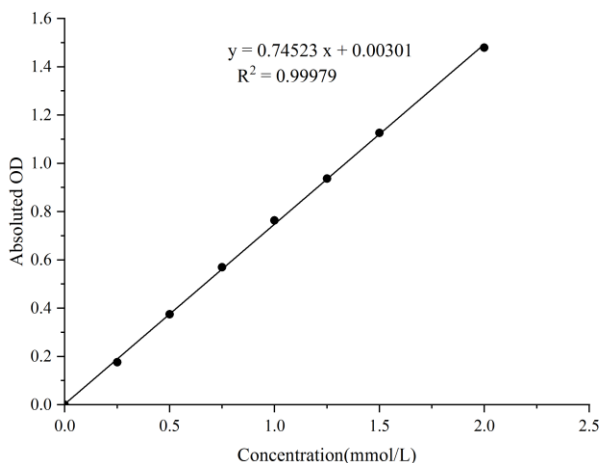
| | | | |
|------|--------------|-----|----------|
| 检测范围 | 0.92-300 U/g | 批间差 | 4.5-5.3% |
| 灵敏度 | 0.92 U/g | 批内差 | 3.5-4.9% |
| 回收率 | 98-103% | | |

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量50 μL , 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

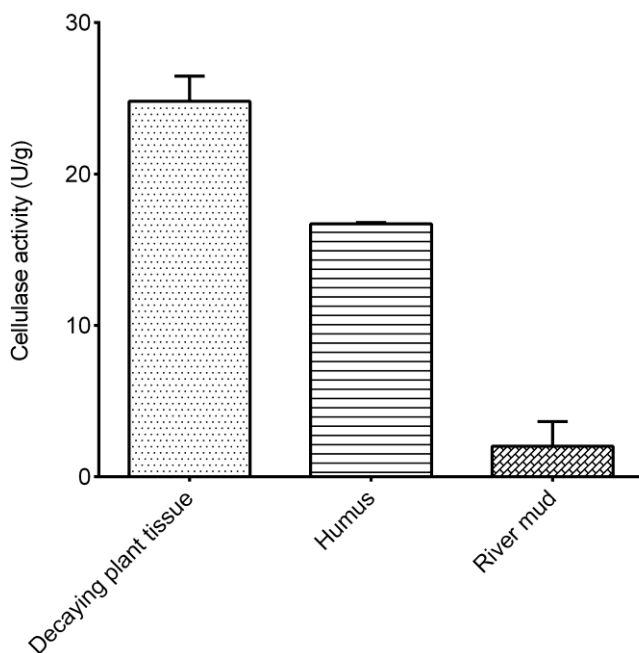
例如检测腐败植物组织(数据仅供参考):

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。

