纤维素酶检测试剂盒(DNS 微板法)

产品简介:

纤维素酶(β-1,4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶，Cellulase 简称 CES) 是降解纤维素生成葡萄糖的一组酶的总称，它不是单体酶，而是起协同作用的多组分酶系，是一种复合酶，主要由外切β-葡聚糖酶、内切β-葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶等组成，还有很高活力的木聚糖酶。在分解纤维素时起生物催化作用，是可以将纤维素分解成寡糖或单糖的蛋白质。

纤维素酶 Cellulase 广泛存在于自然界生物体中。细菌、真菌、动物体内等都能产生纤维素酶。一般用于生产的纤维素酶来自于真菌，比较典型的有木霉属(Trichoderma)、曲霉属（Aspergillus）和青霉属(Penicillium)。微生物纤维素酶在转化不溶性纤维素成葡萄糖以及在果蔬汁中破坏细胞壁从而提高果汁得率等方面具有非常重要的意义。纤维素酶在食品行业和环境行业均有广泛应用。在进行酒精发酵时，纤维素酶的添加可以增加原料的利用率，并对酒质有所提升。

纤维素酶检测试剂盒(DNS 微板法)检测原理是用羧甲基纤维素钠盐(CMC)作底物，经纤维素酶水解后生成还原糖(葡萄糖)，还原糖在碱性加热条件下被氧化成糖酸，3,5-二硝基水杨酸(DNS)被还原为棕红色的氨基化合物，在一定范围内还原糖的量与棕红色产物的颜色深浅程度呈正比，在 540nm 处用酶标仪测定棕红色物质的吸光度，即可求得还原糖的含量，进而求得纤维素酶活的大小。本产品仅用于科研领域，不用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTE0189 100T	Storage
试剂(A): Glu 标准(1mg/ml)	2ml	4℃
试剂(B): CES Assay buffer	20ml	RT
试剂(C): CMC Solution	30ml	RT
试剂(D): DNS 试剂	30ml	RT 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、去离子水或蒸馏水

2、电子天平、振荡器、纱布、离心机、离心管或试管

3、三角瓶、容量瓶、水浴锅、培养箱、酶标仪、96 孔板

操作步骤(仅供参考):

1、标准曲线绘制:取 7 支试管按下表设置,准确吸取 Glu 标准(1mg/ml)与 CES Assay buffer 混匀,即得不同浓度的葡萄糖液。

加入物(μl)	0	1	2	3	4	5	6
Glu 标准(1mg/ml)	0	25	50	75	100	125	150
CES Assay buffer	500	475	450	425	400	375	350
葡萄糖标准(μg/ml)	0	50	100	150	200	250	300

每管中各加 0.3ml DNS 显色液,摇匀后置于沸水浴中准确加热 5min,流水冷却。各管依次抽取 280μl 至 96 孔板中,以"0"号管调零,酶标仪测定 540nm 处各管的吸光度。

2、准备样品:

称取样品 10g(或 10ml)加入装有玻璃珠的三角瓶中,再加人一定体积的蒸馏水稀释,静置 20min,200r/min 振荡 30min,然后四层纱布过滤,滤液 3000r/min 离心 10min,上清液加入 50ml 容量瓶中,补水定容,即为纤维素酶提取液,用于样品 CES 活力的检测。如样品酶活力较高,应稀释至合适浓度再次检测。

3、加样:提前把 CMC Solution 在 60℃水浴中预热。取 3 支离心管按下表设置依次加入:

加入物(ml)	对照管	测定管
酶提取液	-	0.1
CES Assay buffer	0.1	0.1
CMC Solution	0.3	0.3
60℃水浴 20min		
DNS 试剂	0.3	0.3
酶提取液	0.1	-
立即摇匀,放入沸水浴中,显色 5min,立即取出,流水冷却		

4、测定:各管依次抽取 280μl 至 96 孔板中,以"0"号管调零,酶标仪测定 540nm 处各管的吸光度。

计算:

以系列葡萄糖标准(μg/ml) (1~6 号)为横坐标,以相应的吸光度为纵坐标,作图得标准曲线,根据标准曲线计算出酶提取液(对照管、测定管)的吸光度相对应的葡萄糖浓度,根据下式再计算纤维素酶活性。

纤维素酶活力单位定义:在 60℃条件下,1ml 酶提取液,1min 催化羧甲基纤维素钠水解产生 1μg 葡萄糖定义为 1 个酶活力单位(U)。根据酶活性定义,计算出样品中的纤维素酶活性。

$U=k\times(C_1-C_0)/t$ 或 $U=k\times(C_1-C_0)\times V_0/(m\times t)$

式中：U——样品的酶活，单位为 ug/(ml·min)或 ug/(g·min)

k——样品稀释倍数

C_1——样品测定管葡萄糖浓度，单位为μg/ml

C_0——样品对照管葡萄糖浓度，单位为μg/ml

t——酶与底物的反应时间，单位为 min（=20）

V_0——固体样品的酶提取液总体积，单位为 ml

m——称取样品的质量，单位为 g（=10）

注意事项：

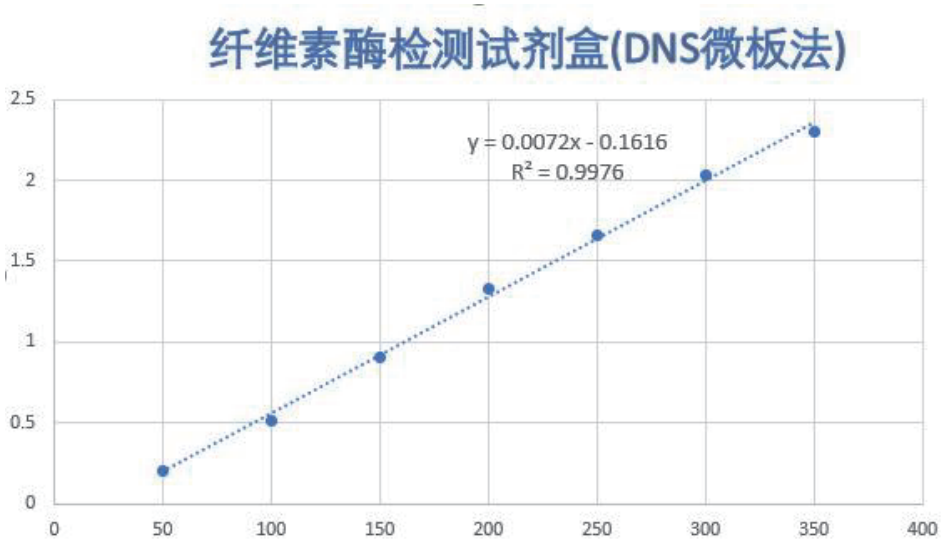
1、 Glu 标准应避免反复冻融，以免失效或效率下降。
2、 待测酶提取液样品如不能及时测定，应置于-20℃保存，3 天内稳定。
3、 如果样品酶活性过高，应用蒸馏水稀释酶提取液后重测，结果乘以稀释倍数。
4、 待测样品中不能含有纤维素酶抑制剂，同时需避免反复冻融。
5、 纤维素酶的最适 pH 一般在 4.5~6.5。葡萄糖酸内酯能有效的抑制纤维素酶，重金属离子如铜和汞离子，也能抑制纤维素酶，但是半胱氨酸能消除它们的抑制作用，甚至进一步激活纤维素酶。植物组织中含有天然的纤维素酶抑制剂；它能保护植物免遭霉菌的腐烂作用，这些抑制剂是酚类化合物。如果植物组织中存在着高的氧化酶活力，那么它能将酚类化合物氧化成醌类化合物，后者能抑制纤维素酶。
6、 本试剂盒亦适用于其他样品的纤维素酶活性测定，但需有相关资料做为参考依据。
7、 CES Assay buffer 如果出现浑浊或絮状物，应弃用。
8、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
9、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：12 个月有效。室温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCDZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
GCTO1013	丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)

附录： 在室温条件下根据说明书步骤操作，测定葡萄糖标准溶液的浓度依次为50、100、150、200、250、300、350、400、450、500μg/ml，采用酶标仪 540nm 测出其相应的吸光度，据此做出如下标准曲线。



采用酶标仪 540nm 测定，“0”号管吸光度为 0.14 左右，呈黄色，100μg/ml 以上呈棕红色并逐渐加深。测定结果显示，当葡萄糖浓度大于 350μg/ml 时，OD 值开始偏离，当葡萄糖浓度在 100~250μg/ml 以内比较合适，因此当测定结果明显偏高应稀释后再测。因测定仪器及操作手法等不同，测定结果可有一定偏差。