CheKine™ 外切-β-1,4-葡聚糖酶（C1）活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB3019　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

≠	**检测范围：**40-600 μg/mL		**灵敏度：**40 μg/mL
	适用样本：动物组织、真菌		
	保质期：4℃，避光保存 6 个月		

01 背景与原理

外切-β-1,4-葡聚糖酶(Exo-β-1,4-Cellobiohydrolase)，(EC 3.2.1.91)存在于真菌和动物体内，是纤维素酶系的组份之一，C1 催化多聚糖链的末端非还原端释放出纤维二糖和葡萄糖。

本试剂盒检测原理时采用 3,5－二硝基水杨酸法测定 C1 催化微晶纤维素降解产生的还原糖的含量，生成的棕红色氨基化合物在 540 nm 有特征光吸收，在一定范围内 540 nm 光吸收增加速率与 C1 活性成正比。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	120 mL	4℃
Reagent Ⅰ	6 mL	12 mL	4℃，避光保存
Reagent Ⅱ	30 mL	60 mL	4℃，避光保存
Standard	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 540 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水、PBS	标品稀释用/样本清洗用
其他	匀浆器或研钵（组织样本）、低温离心机、水浴锅、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存；Reagent Ⅰ浑浊或出现白色沉淀是正常现象，使用前摇晃数次混匀
Reagent Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存；**Reagent Ⅱ有一定的刺激性，建议在使用过程中做好个人防护**
10 mg/mL Standard	临用前配制；每瓶加入 1 mL 去离子水，充分溶解，即 10 mg/mL 葡萄糖标准品	未用完的试剂 4℃保存 2 周

05-1-2 标准品配制

使用 10 mg/mL 葡萄糖标准品，按下表所示，进行下一步稀释。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	Standard 体积（μL）	去离子水体积（μL）	浓度（μg/mL）
1	60 μL of 10 mg/mL Standard	940	600
2	600 μL of 600 μg/mL	300	400
3	600 μL of 400 μg/mL	600	200
4	600 μL of 200 μg/mL	600	100
5	800 μL of 100 μg/mL	200	80
6	500 μL of 80 μg/mL	500	40
空白	0	500	0

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把完整真菌或者分装的组织块保存在-80℃，一个月内使用。当准备好进行该项实验时，将样本从-80℃拿出后，冰上解冻。但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期。

- **动物组织**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，10000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。
- **真菌**：收集 5×10^6 个真菌，用预冷的 PBS 清洗真菌，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL Extraction Buffer 进行冰浴超声破碎。超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），4℃，10000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 540 nm。
2. **检测体系配制**：空白孔和标准孔只需做 1 次，每个测定孔均需设置一个对照孔。在 1.5 mL EP 管中按照如下方式操作：

试剂	测定管（μL）	对照管（μL）	标准管（μL）	空白管（μL）
样本	10	10	0	0
Reagent Ⅰ	100	0	0	0
去离子水	0	100	0	0
混匀，37℃准确反应 2 h				
Standard	0	0	110	0
去离子水	0	0	0	110
Reagent Ⅱ	200	200	200	200

3. **吸光度检测：**混匀，沸水浴 10 min（盖紧，以防止水分散失），流水冷却至室温后 5000 g，室温离心 5 min，取 200 μL 至 96 孔板中，测定 540 nm 处吸光度，分别记为 $A_{测定}$、$A_{对照}$、$A_{标准}$、$A_{空白}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”工具。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$、$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线。将$\Delta A_{测定}$代入方程得到 y 值(μg/mL)。

3. 样本 C1 活性计算

- 按蛋白浓度计算

单位的定义：37℃，每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$C1\ (U/mg)=y\times V_{反总}\div V_{样}\div Cpr\div T$**$=0.092y\div Cpr$**

- 按样本鲜重计算

单位的定义：37℃，每 g 组织每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$C1\ (U/g)=y\times V_{反总}\div V_{样}\times V_{样总}\div W\div T$**$=0.092y\div W$**

- 按真菌数量计算

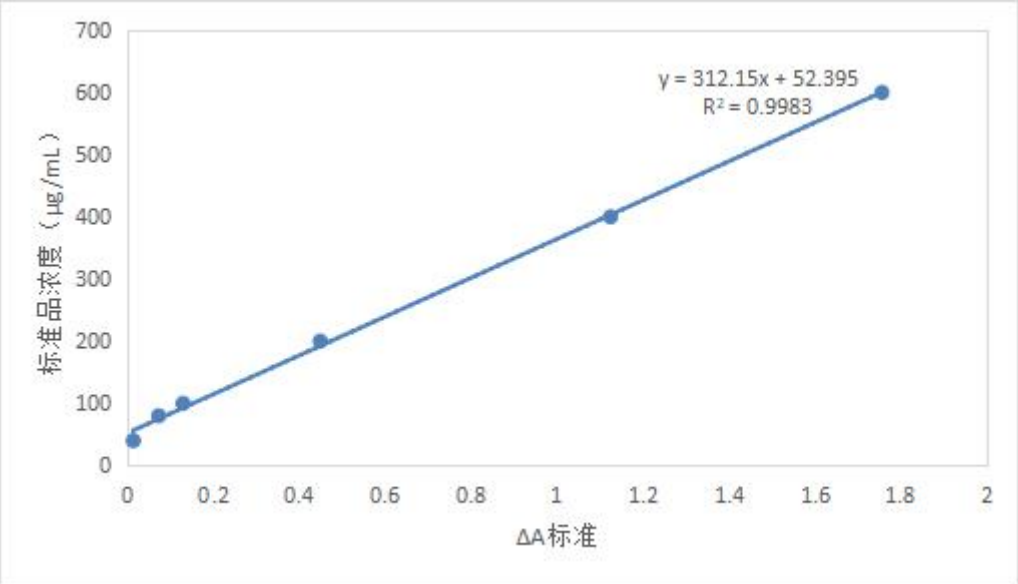
单位的定义：37℃，每 10^4 个真菌每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$C1\ (U/10^4)=y\times V_{反总}\div V_{样}\times V_{样总}\div N\div T$**$=0.092y\div N$**

$V_{反总}$：酶促反应体积，0.11 mL；$V_{样}$：加入样本体积，0.01 mL；$V_{样总}$：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 h=120 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=500）。

07 结果展示

典型标准曲线：$y=312.15x+52.395$，$R^2=0.9983$



示例-1：取 0.1 g 小鼠胃，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=2.010-1.602=0.408$，代入标准曲线，计算 y=179.752。按样本质量计算得：C1 (U/g)=0.092y÷W=165.372 U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本$\Delta A_{测定}$过高或者过低怎么办?**

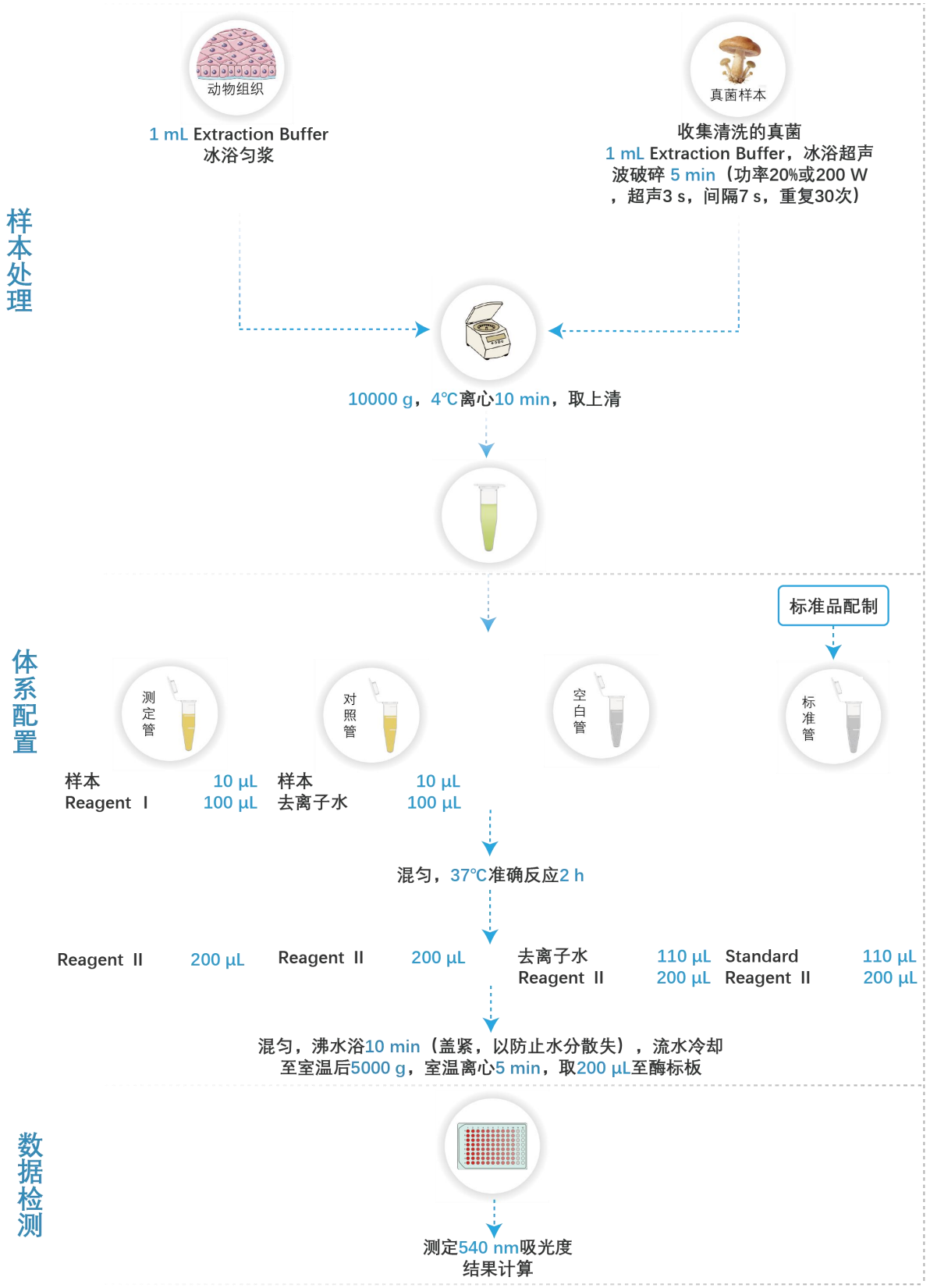
如果$\Delta A_{测定}$小于 0.01 可适当加大样本量。如果$\Delta A_{测定}$大于 600 μg/mL 的$\Delta A_{标准}$，样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1150	CheKine™ 过氧化物酶（POD）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1030	CheKine™ 超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1040	CheKine™ 过氧化氢酶（CAT）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 外切-β-1,4-葡聚糖酶（C1）活性检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB3019）



V1.0