

普鲁兰酶活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10311W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

普鲁兰酶是一种水解酶, 广泛存在于微生物及动物、植物体内, 能专一地分解淀粉和糖原及其衍生物分枝点的 α -1,6-葡萄糖苷键。它的这种特性最早被用于淀粉结构的理论研究, 到七十年代, 普鲁兰酶的应用已扩展到淀粉糖浆、啤酒和酒精生产等多个淀粉深加工领域, 并逐步从实验室阶段走向工业化规模。

普鲁兰酶催化普鲁兰分解产生还原糖, 进一步与 3,5-二硝基水杨酸反应, 生成棕红色氨基化合物, 经光谱扫描在 540nm 有特征光吸收, 在一定范围内 540nm 光吸收值与还原糖生成量成正比。通过光吸收增加速率来计算普鲁兰酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 22mL 试剂一充分溶解, 溶解后可能出现粘稠状, 需混匀后再使用; 3. 用不完的试剂 4℃保存;
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 1 支	-20℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称样本 0.1g (水分充足的样本可取 0.5g) 于研钵中, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆后转入离心管中。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取

② 液体样本: 直接测定。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入:

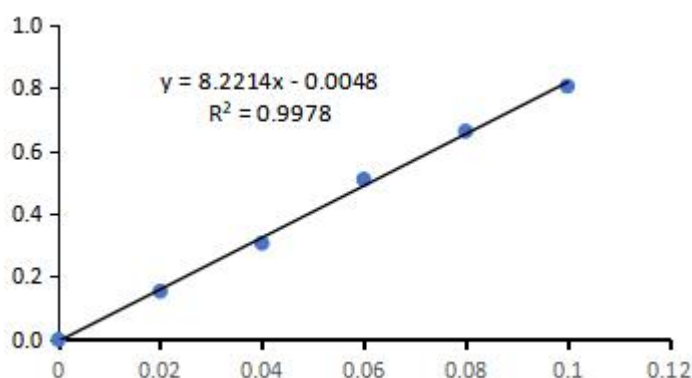
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20 (95℃煮沸 10min 的酶液)
试剂二	100	100

混匀，50℃孵育 30min		
试剂三	100	100
混匀，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却至室温。		
蒸馏水	500	500
混匀，取出 200μL 至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

- 【注】: 1. 若 A 测定管的吸光值大于 2, 可以用蒸馏水对整个显色混合液用蒸馏水进行稀释(如取显色混合液 100 μL 至 96 孔板中, 再加 100 μL 蒸馏水, 即稀释 2 倍), 则稀释倍数 D 需代入公式计算。或减少上清液体积 V1 (如减至 10 μL, 则加 10 μL 蒸馏水补齐), 则 V1 需代入公式重新计算。
2. 若 ΔA 值在零附近徘徊, 可增加样本加样体积 V1 (如增至 40 μL, 则最后蒸馏水体积相应减少, 保持反应总体积不变), 或延长 50℃孵育时间 T (如增至 60min), 则相应的 V1 和反应时间 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

- 1、标准曲线方程为 $y = 8.2214x - 0.0048$; x 为标准品质量 (mg), y 为 ΔA 。



- 2、按蛋白浓度计算:

单位定义: 37℃每毫克蛋白每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0048) \div 8.2214 \times 10^3] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 202.7 \times (\Delta A + 0.0048) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

- 3、按鲜重计算:

单位定义: 37℃每克组织每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0048) \div 8.2214 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 202.7 \times (\Delta A + 0.0048) \div W \end{aligned}$$

- 4、按液体样本计算:

单位定义: 37℃每毫升液体样本每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL 液体}) &= [(\Delta A + 0.0048) \div 8.2214 \times 10^3] \div V1 \div T \\ &= 202.7 \times (\Delta A + 0.0048) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.02mL;

T---反应时间, 30min;

W---样本鲜重, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的蛋白含量(考马斯亮蓝法)试剂盒, 不建议使用蛋白含量(BCA 法) 试剂盒;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水(母液需在两天内用且-20℃保存), 标准品母液浓度为 5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 1, 2, 3, 4, 5. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下:

标品浓度 mg/mL	0	1	2	3	4	5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水	100	120
试剂三	100	100
混匀, 95℃水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却至室温。		
蒸馏水	500	500
混匀, 取 200μL 至 96 孔板中, 540nm 下测定, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		