

果聚糖水解酶活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10324F 分光法 24 样 有效期: 3 个月)

一、产品简介:

果聚糖水解酶 (Levanase, EC 3.2.1.65) 的作用有以下几点: 水解果聚糖能保证能量供给, 快速升高渗透压, 在压力下增加低聚果糖浓度等, 从而维持基质稳定来实现御寒功能。

果聚糖水解酶水解底物果聚糖产生还原性糖。利用 3,5-二硝基水杨酸测定还原糖的量, 在 540nm 读取吸光值, 进而得出果聚糖水解酶的活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂一	液体 32mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 临用前加 12mL 试剂一混匀溶解, 仍 4°C保存。
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉体 1 支	4°C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、所需的仪器和用品:

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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 组织: 称取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 5min; 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液, 涡旋混匀, 4°C放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 10min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。
- ② 细菌/培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500: 1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本: 若是澄清液体, 直接检测, 若液体样本浑浊, 需 4°C×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

2、上机检测:

- ① 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 EP 管中依次加入:

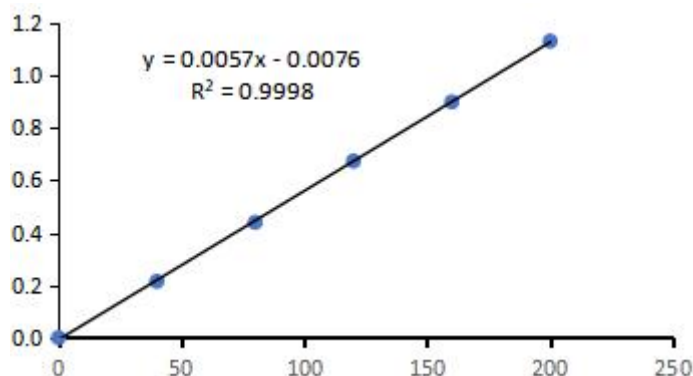
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	200	200
试剂一	200	200
试剂二	200	
混匀, 37℃ 准确水浴 30min 后,		
试剂三	200	200
试剂二		200
混匀, 95℃ 水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀, 吸取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定管需设一个对照管)。		

【注】: 1. 若吸光值大于 1.5, 可以用蒸馏水稀释样本后测定, 计算公式中乘以相应稀释倍数 D。

2. 若 ΔA 值在零附近徘徊, 可增加样本加样体积 V1 (如增至 400 μL, 则试剂一相应减少), 或延长 37℃ 水浴时间 (如增至 60min 或更长), 则相应 V1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程为 $y = 0.0057x - 0.0076$; x 为标准品质量 (μg), y 为 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每小时催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0076) \div 0.0057] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 1754.4 \times (\Delta A + 0.0076) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每小时催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0076) \div 0.0057] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 1754.4 \times (\Delta A + 0.0076) \div W \end{aligned}$$

4、按细菌/细胞密度计算:

单位定义: 每 1 万个细菌或细胞每小时催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0076) \div 0.0057] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 3.5 \times (\Delta A + 0.0076) \end{aligned}$$

5、按液体体积计算:

单位定义: 每毫升液体每小时催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0076) \div 0.0057] \div V1 \div T = 1754.4 \times (\Delta A + 0.0076)$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入样本体积, 0.2mL;

T---反应时间, 30 min=0.5h; W---样本质量, g; 500---细菌或细胞总数, 500 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒;

附：标准曲线制作过程：

- 1 向标准品 EP 管里加入 1mL 蒸馏水(母液需在两天内用且-20℃保存),标准品母液浓度为 2mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品,例如: 0, 0.2,0.4,0.6,0.8, 1. 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:

吸取标准品母液 500uL, 加入 500uL 蒸馏水, 混匀得到 1mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
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	200	
蒸馏水		200
试剂一	400	400
试剂三	200	200
95℃水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀, 吸取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		