

果聚糖水解酶（Levanase）活性测定试剂盒说明书

（货号：BP10325W 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 32mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前加 12mL 试剂一混匀溶解； 2. 仍 4℃保存。
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 1 支	4℃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：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℃放置 10min；12000rpm，4℃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℃放置 10min；12000rpm，4℃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℃放置 10min；12000rpm，4℃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℃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℃×12000rpm，离心 10min，取上清液检测。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	100	100

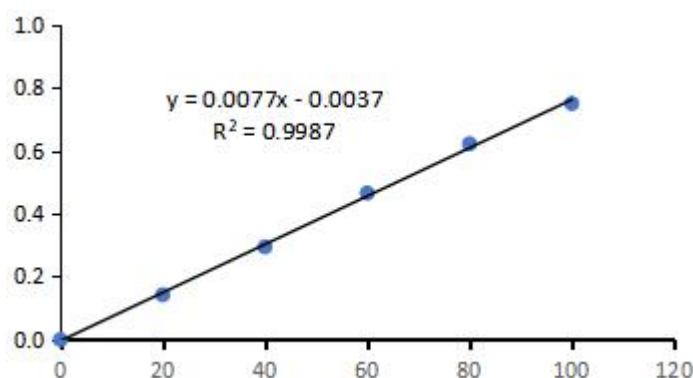
试剂一	100	100
试剂二	100	
混匀，37℃准确水浴 30min 后，		
试剂三	100	100
试剂二		100
混匀，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，吸取 200μL 转移至 96 孔板中，540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管需设一个对照管）。		

【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（如增至 200μL，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 $y = 0.0077x - 0.0037$ ；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。

$$\begin{aligned} \text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0037) \div 0.0077] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 2597.4 \times (\Delta A + 0.0037) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0037) \div 0.0077] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 2597.4 \times (\Delta A + 0.0037) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0037) \div 0.0077] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 5.2 \times (\Delta A + 0.0037) \end{aligned}$$

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。

$$\text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0037) \div 0.0077] \div V1 \div T = 2597.4 \times (\Delta A + 0.0037)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.1mL；

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	100	
蒸馏水		100
试剂一	200	200
试剂三	100	100
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 200μL 转移至 96 孔板中, 于 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		