

普鲁兰酶活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TDX051 分光法 48 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	用前甩几下使粉剂落入底部,再加入 12mL 试剂一充分溶解备用;用不完的试剂 4℃ 保存;
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体 1 支	4℃ 保存	若重新做标曲,则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、普鲁兰酶活性测定:

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、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 540nm,蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

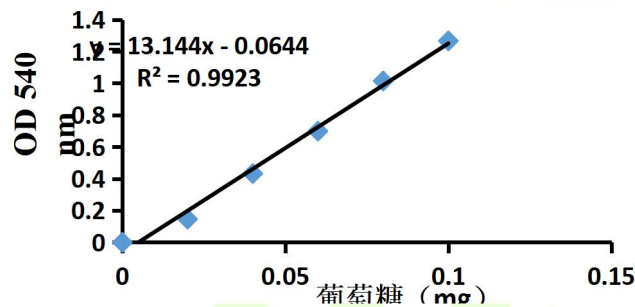
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	20	20 (95℃煮沸 10min 的酶液)
试剂二	100	100
混匀, 50℃ 孵育 30min		
试剂三	100	100
混匀, 95℃ 水浴 10min (用封口膜缠紧,以防止水分散失), 流水冷却至室温。		
蒸馏水	500	500

混匀，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）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 360 μ L 至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，再加 360 μ L 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 μ L，则加 10 μ L 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 μ L，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 $^{\circ}$ C 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 $y = 13.144x - 0.0644$ ；x 为标准品质量（mg），y 为 ΔA 。



- 2、按蛋白浓度计算：

单位定义：37 $^{\circ}$ C 每毫克蛋白每分钟产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0644) \div 13.144 \times 10^3] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 126.8 \times (\Delta A + 0.0644) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

- 3、按鲜重计算：

单位定义：37 $^{\circ}$ C 每克组织每分钟产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0644) \div 13.144 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 126.8 \times (\Delta A + 0.0644) \div W \end{aligned}$$

- 4、按液体样本计算：

单位定义：37 $^{\circ}$ C 每毫升液体样本每分钟产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL 液体}) &= [(\Delta A + 0.0644) \div 13.144 \times 10^3] \div V1 \div T \\ &= 126.8 \times (\Delta A + 0.0644) \end{aligned}$$

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 制备标准品母液（5mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 1, 2, 3, 4, 5. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照：20 μ L 标准品+100 μ L 蒸馏水+100 μ L 试剂三，95 $^{\circ}$ C 水浴 10min，冷却后，再加 500 μ L 蒸馏水，混匀，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，540nm 下测定，根据结果即可制作标准曲线。