

普鲁兰酶活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX051 微板法 96 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 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℃ 保存	用前甩几下使粉剂落入底部,再加入 22mL 试剂一充分溶解备用;用不完的试剂 4℃ 保存;
试剂三	液体 20mL×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:

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入:

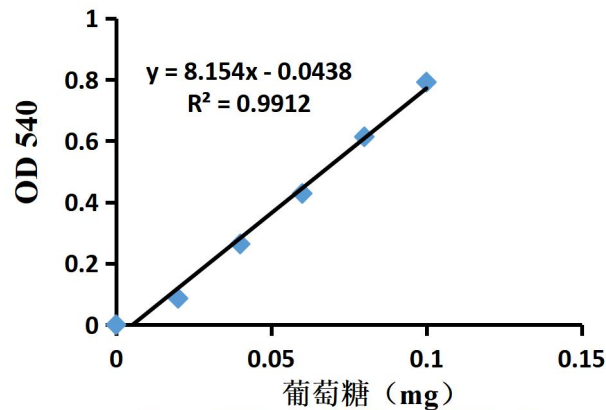
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	20	20 (95℃煮沸 10min 的酶液)
试剂二	100	100
混匀, 50℃ 孵育 30min		
试剂三	100	100
混匀, 95℃ 水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却至室温。		
蒸馏水	500	500
混匀, 取出 200 μ L 至 96 孔板中, 于 540nm 处读取吸光值 A,		

$\Delta A = A$ 测定-A 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 μ L 至 96 孔板中, 再加 100 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 $y = 8.154x - 0.0438$; 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。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0438) \div 8.154 \times 10^3] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 204.4 \times (\Delta A + 0.0438) \div Cpr \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0438) \div 8.154 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 204.4 \times (\Delta A + 0.0438) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL 液体}) &= [(\Delta A + 0.0438) \div 8.154 \times 10^3] \div W \times V1 \div T \\ &= 204.4 \times (\Delta A + 0.0438) \end{aligned}$$

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, 取 200 μ L 至 96 孔板中, 540nm 下测定, 根据结果即可制作标准曲线。