

β -1,3-1,4-葡聚糖酶 (β -1,3-1,4-glucanase) 酶活试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX050 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

β -1,3-1,4-葡聚糖酶 (又称地衣多糖酶; EC 3.2.1.73) 是一类重要的水解酶, 可以水解谷物中的 β -1,3-1,4-葡聚糖, 其在食品、饲料和纺织等领域的具有重要应用价值。

β -1,3-1,4-葡聚糖酶水解底物葡聚糖产生还原性糖。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 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水, 80℃水浴 10min 充分溶解, 冷却至室温待用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 30mL×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、 β -1,3-1,4-葡聚糖酶 (β -1,3-1,4-GA) 活性测定:

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:

取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g) 到研钵内, 加入 1mL 提取液, 在冰上进行冰浴匀浆或者液氮研磨。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

[注]: 也可以按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取。

② 细菌/真菌样本:

先收集细菌/真菌到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌/真菌加入 1mL 提取液; 冰浴超声波破碎细菌/真菌 (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]: 也可按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 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：

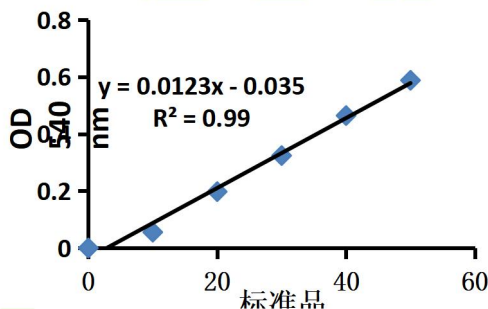
- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。
② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一	140	150
试剂二	10	
混匀，37℃孵育 30min		
试剂三	150	150
混匀，95℃水浴 5min，取出后用自来水或冰水冷却至室温，取 200μL 澄清液体于 96 孔板中，在 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个样本做一个对照管）。		

【注】：若 ΔA 在零附近徘徊，可在样本提取时加大取样质量 W（如增至 0.5g），或在检测步骤时加大上样量 V1（由 50μL 增加到 100μL，则试剂一相应减少，保持总体积不变），或延长反应时间 T（如增至 60min），则改变后的 W、V1 和 T 需带入计算公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.0123x - 0.035$ ；x 为标准品浓度（μg），y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟分解葡聚糖产生 1μg 还原性糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-1,4-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.035) \div 0.0123] \div (V1 \times Cpr) \div T$$

$$= 54.2 \times (\Delta A + 0.035) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织样本每分钟分解葡聚糖产生 1μg 还原性糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-1,4-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.035) \div 0.0123] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 54.2 \times (\Delta A + 0.035) \div W$$

4、按细菌/真菌数量计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或真菌每分钟分解葡聚糖产生 1μg 还原性糖定义一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-1,4-GA}(\mu\text{g}/\text{min} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.035) \div 0.0123] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.11 \times (\Delta A + 0.035)$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体中每分钟分解葡聚糖产生 1μg 还原性糖定义一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-1,4-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.035) \div 0.0123] \div V1 \div T = 54.2 \times (\Delta A + 0.035)$$

V---提取液体积, 1mL;

V1---样本上样体积, 50 μ L=0.05mL;

T---反应时间, 30min;

W---样本鲜重, g;

500---细菌/真菌总数, 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 制备标准品 (1mg/mL): 从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中, 再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的葡萄糖 (母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 50 μ L 标准品+150 μ L 试剂一+150 μ L 试剂三, 混匀 95 $^{\circ}$ C水浴 5min, 取出后用自来水或冰水冷却至室温, 取 200 μ L 澄清液体于 96 孔板中, 在 540nm 处读取吸光值 A, 根据结果即可制作标准曲线。