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°C保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4°C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. 加入 12mL 试剂一充分溶解，溶解后可能出现粘稠状，需混匀后再使用； 3. 用不完的试剂 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	-20°C避光保存	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（μL）	测定管	对照管
样本	20	20 （95°C煮沸 10min 的酶液）
试剂二	100	100

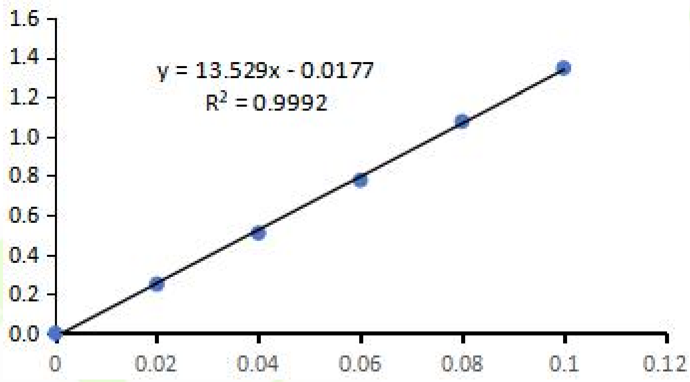
混匀，50℃孵育 30min		
试剂三	100	100
混匀，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却至室温。		
蒸馏水	500	500
混匀，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 540nm 处读取吸光值 A，ΔA＝A 测定-A 对照（每个样本做一个自身对照）。		

【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 360μL 至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，再加 360μL 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 10μL，则加 10μL 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 40μL，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˚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＝13.529x - 0.0177；x 为标准品质量（mg），y 为ΔA。



2、按蛋白浓度计算：

单位定义：37℃每毫克蛋白每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

普鲁兰酶活性（μg/min /mg prot）$=[(\Delta A+0.0177)\div 13.529\times 10^3]\div(V1\times Cpr)\div T$

$=123.2\times(\Delta A+0.0177)\div Cpr$

3、按鲜重计算：

单位定义：37℃每克组织每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

普鲁兰酶活性（μg/min /g 鲜重）$=[(\Delta A+0.0177)\div 13.529\times 10^3]\div(W\times V1\div V2)\div T$

$=123.2\times(\Delta A+0.0177)\div W$

4、按液体样本计算：

单位定义：37℃每毫升液体样本每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

普鲁兰酶活性（μg/min /mL 液体）$=[(\Delta A+0.0177)\div 13.529\times 10^3]\div V1\div T$

$=123.2\times(\Delta A+0.0177)$

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 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存），标准品母液浓度为 5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 1, 2, 3, 4, 5. 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：

标品浓度 mg/mL	0	1	2	3	4	5
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	20	
蒸馏水	100	120
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，540nm 下测定，△A=A 测定-0 浓度管。		