

果聚糖水解酶活性测定试剂盒说明书

(分光法 24 样)

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 32mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 12mL 试剂一混匀溶解,仍 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)、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、果聚糖水解酶活性测定：

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: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、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 所有试剂解冻至室温 (25℃),在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	200	200
试剂一	200	200
试剂二	200	
混匀, 37℃ 准确水浴 30min 后,		
试剂三	200	200

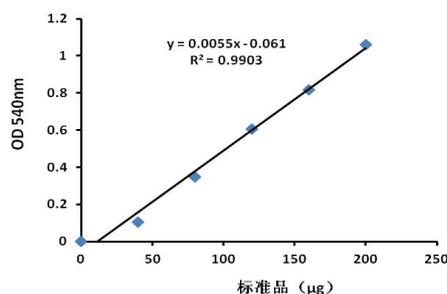
试剂二		200
混匀，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，吸取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。		

【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 V1（如增至 400 μ L，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 $y = 0.0055x - 0.061$ ；x 为标准品质量（ μ g），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 1 μ g 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.061) \div 0.0055] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 1818.2 \times (\Delta A + 0.061) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

单位定义：每克组织每小时催化产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.061) \div 0.0055] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 1818.2 \times (\Delta A + 0.061) \div W \end{aligned}$$

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 1 μ g 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.061) \div 0.0055] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 3.6 \times (\Delta A + 0.061) \end{aligned}$$

5、按液体体积计算:

单位定义：每毫升液体每小时催化产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h/mL}) = [(\Delta A + 0.061) \div 0.0055] \div V1 \div T = 1818.2 \times (\Delta A + 0.061)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.2mL；

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 制备标准品母液(2mg/mL)：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)。
- 2 把母液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 200 μ L 标准品+400 μ L 试剂一+200 μ L 试剂三，95℃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，吸取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 540nm 处读取吸光值 A，根据结果即可制作标准曲线。