

普鲁兰酶活性测定试剂盒

微板法 96 样

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。

试剂盒组成和配制

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	用前用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 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

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。

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 (μL)	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 10 min (用封口膜缠紧，以防止水分散失)，流水冷却至室温。

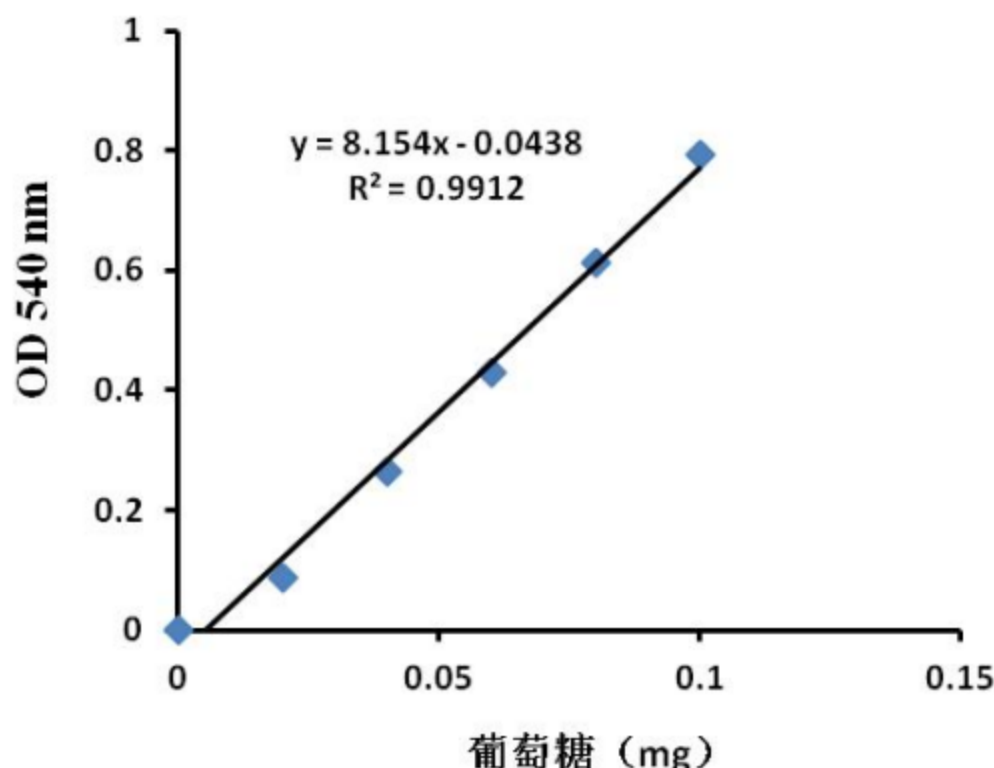
蒸馏水	500	500
混匀，取出 200μL 至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

[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 100μL 至 96 孔板中，再加 100μL 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, 则后蒸馏水体积相应减少，保持反应总体积不变)，或延长 50℃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。

结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 8.154x - 0.0438$; x 为标准品质量 (mg)，y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

单位定义：37℃每毫克蛋白每分钟产生 1μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0438) \div 8.154 \times 103] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 204.4 \times (\Delta A + 0.0438) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0438) \div 8.154 \times 103] \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 204.4 \times (\Delta A + 0.0438) \div W\end{aligned}$$

4、按液体样本计算：

单位定义：37℃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。

$$\begin{aligned}\text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL 液体}) &= [(\Delta A + 0.0438) \div 8.154 \times 103] \div W \times V1 \div T \\ &= 204.4 \times (\Delta A + 0.0438)\end{aligned}$$

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°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°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。

mlbio 酶联生物
Good elisakit producers