

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0962

Size: 50T/48S

普鲁兰酶活性检测试剂盒说明书

分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定（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！）

一、测定意义：

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 $\alpha-1,6$ -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。

二、测定原理：

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。

三、需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 15mL × 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 12mL 试剂一充分溶解备用；用不完的试剂 4℃ 保存；
试剂三	液体 10mL × 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

五、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°C 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°C 孵育 30min		
试剂三	100	100
混匀, 95°C 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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)		

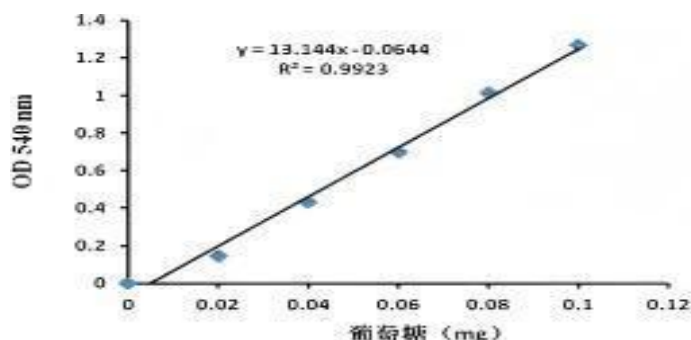
【注】：

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 360 μL 至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，再加 360 μL 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 μL，则加 10 μL 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 μL，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℃ 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。

六、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 13.144x - 0.0644$ ；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 1 μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{普鲁兰酶活性} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0644) \div 13.144 \times 10^3] \div (V1 \times C_{pr}) \div T = 126.8 \times (\Delta A + 0.0644) \div C_{pr}$$

3、按鲜重计算：

单位定义：37℃每克组织每分钟产生 1 μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0644) \div 13.144 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 126.8 \times (\Delta A + 0.0644) \div W \end{aligned}$$

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 1 μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{普鲁兰酶活性 (U/mL 液体)} &= [(\Delta A + 0.0644) \div 13.144 \times 10^3] \div V1 \div T \\ &= 126.8 \times (\Delta A + 0.0644)\end{aligned}$$

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℃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 μL 标准品+100 μL 蒸馏水+100 μL 试剂三，95℃水浴 10min ，冷却后，再加 500 μL 蒸馏水，混匀，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中，540nm 下测定，根据结果即可制作标准曲线。