

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-S0963

Size: 100T/96S

普鲁兰酶检测试剂盒说明书

微板法

***正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

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 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。

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：

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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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	使用前甩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

五、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！

● 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

● 上机检测：

1) 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

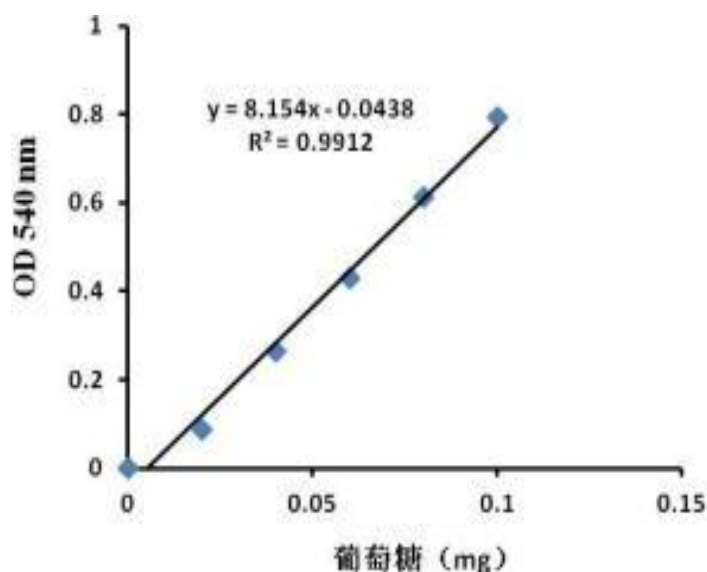
2) 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20 (95°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, 取出 200 μL 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 100 μL 至 96 孔板中, 再加 100 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°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。

六、结果计算：



1、标准曲线方程为 $y = 8.154x - 0.0438$; 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 1 μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0438) \div 8.154 \times 10^3] \div (V1 \times C_{pr}) \div T$$

$$= 204.4 \times (\Delta A + 0.0438) \div C_{pr}$$

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。

$$\text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0438) \div 8.154 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V2) \div T$$

$$= 204.4 \times (\Delta A + 0.0438) \div W$$

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 1 μg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\text{普鲁兰酶活性 } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL 液体}) = [(\Delta A + 0.0438) \div 8.154 \times 10^3] \div W \times V1 \div T$$

$$= 204.4 \times (\Delta A + 0.0438)$$

V---加入提取液体积, 1mL;

T---反应时间, 30min;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.02mL; 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 μ L 标准品+100 μ L 蒸馏水+100 μ L 试剂三, 95℃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。