

β-1,3-1,4-葡聚糖酶 (β-1,3-1,4-glucanase) 酶活试剂盒说明书

(货号: BN72111 分光法 48 样)

一、产品简介:

β-1,3-1,4-葡聚糖酶 (又称地衣多糖酶; EC 3.2.1.73) 是一类重要的水解酶, 可以水解谷物中的β-1,3-1,4-葡聚糖, 其在食品、饲料和纺织等领域的具有重要应用价值。

β-1,3-1,4-葡聚糖酶水解底物葡聚糖产生还原性糖。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β-1,3-1,4-葡聚糖酶的活性大小。

二、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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水, 80℃水浴 10min 充分溶解, 冷却至室温待用。
试剂三	液体 30mL×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

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)、可调试移液器、台式离心机、水浴锅、移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、β-1,3-1,4-葡聚糖酶 (β-1,3-1,4-GA) 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:

取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g) 到研钵内, 加入 1mL 提取液, 在冰上进行冰浴匀浆或者液氮研磨。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

[注]: 也可以按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取。

② 细菌/真菌样本:

先收集细菌/真菌到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌/真菌加入 1mL 提取液; 冰浴超声波破碎细菌/真菌 (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】: 也可按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 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:

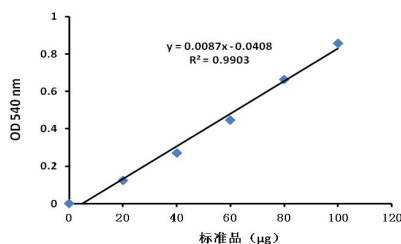
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	280	300
试剂二	20	
37℃孵育 30min		

试剂三	300	300
混匀, 95°C水浴 5min, 取出后用自来水或冰水冷却至室温, 取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 在 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管 (每个样本做一个对照管)。		

【注】:若 ΔA 在零附近徘徊, 可在样本制备时加大取样质量 W (如增至 0.5g), 或在上机检测时加大上样量 V1 (由 100 μ L 增加到 200 μ L, 则试剂一相应减少, 保持总体积不变), 或延长反应时间 T (如增至 60min), 则改变后的 W、V1 和 T 需带入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0087x - 0.0408$; x 为标准品浓度 (μ g), y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟分解葡聚糖产生 1 μ g 还原性糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-1,4-GA}(\mu\text{g/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0408) \div 0.0087] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ = 38.3 \times (\Delta A + 0.0408) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织样本每分钟分解葡聚糖产生 1 μ g 还原性糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-1,4-GA}(\mu\text{g/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0408) \div 0.0087] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 38.3 \times (\Delta A + 0.0408) \div W$$

4、按细菌/真菌数量计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌或真菌每分钟分解葡聚糖产生 1 μ g 还原性糖定义一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-1,4-GA}(\mu\text{g/min} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0408) \div 0.0087] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.08 \times (\Delta A + 0.0408)$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体中每分钟分解葡聚糖产生 1 μ g 还原性糖定义一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-1,4-GA}(\mu\text{g/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0408) \div 0.0087] \div (V1 \times Cpr) \div T = 38.3 \times (\Delta A + 0.0408) \div Cpr$$

V---提取液体积, 1mL;

V1---样本上样体积, 100 μ L = 0.1mL;

T---反应时间, 30min;

W---样本鲜重, g;

500---细菌/真菌总数, 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 (1mg/mL): 从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中, 再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的葡萄糖 (母液需在两天内用且 -20°C 保存)。
- 2 把母液用蒸馏水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 100 μ L 标准品+300 μ L 试剂一+300 μ L 试剂三, 混匀 95°C水浴 5min, 取出后用自来水或冰水冷却至室温, 取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 在 540nm 处读取吸光值 A, 根据结果即可制作标准曲线。