

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: G0574F 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°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	4°C保存	用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水, 80°C水浴 10min 充分溶解, 冷却至室温待用。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C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)、可调式移液器、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, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

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°C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。

【注】:若样本 (如果实样本) 含有高还原糖 (如果糖和葡萄糖), 可参考以下步骤处理样本:

称取约 0.2g 组织 (若水分充足, 需增加样本取样质量的话, 需保证乙醇在整个液体中体积至少 80%), 加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆, 4°C放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入经预冷的 85%乙醇混匀, 4°C放置 10min; 12000rpm, 4°C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°C放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 10min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。

- 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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】:也可按照细菌或细胞数量 (10^4 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°C离心后取上清液检测。

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°C) 或于水浴锅中孵育 15-30min, 在 EP 管中依次加入:

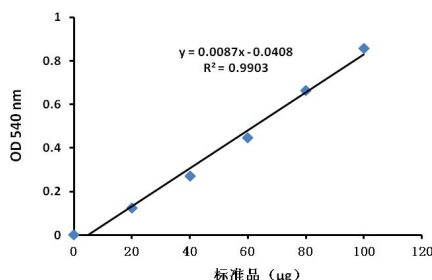
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	280	300
试剂二	20	
混匀后, 37°C孵育 30min		

试剂三	300	300
混匀，95℃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】:1.若 ΔA 小于 0.01，可增加上样量 V1(由 100 μ L 增至 200 μ L，则试剂一相应减少)，或延长反应时间 T(如增至 60min)，或增加取样质量 W，则改变后的 V1 和 T 和 W 需带入公式重新计算
2.若 A 测定值大于 2，可考虑对样本用蒸馏水稀释后检测，则稀释倍数 D 带入公式计算。

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。

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

- 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。

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

- 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。

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

- 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。

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

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，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

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℃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。
- 3 依据 100 μ L 标准品+300 μ L 试剂一+300 μ L 试剂三，混匀 95℃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。