

**$\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶 ( $\beta$ -1,3-1,4-glucanase) 酶活试剂盒说明书**

(微板法 96 样)

**一、产品简介:**

$\beta$ -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 $\beta$ -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。

$\beta$ -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 $\beta$ -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 120mL×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	临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:**

酶标仪、96 孔板、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、 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶 ( $\beta$ -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°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。

**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×12000rpm,离心 10min,取上清液检测。

**2、上机检测:**

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 540nm。

② 所有试剂解冻至室温(25°C),在 EP 管中依次加入:

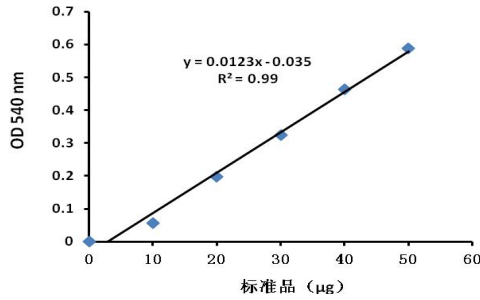
试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一	140	150
试剂二	10	
混匀, 37°C 孵育 30min		
试剂三	150	150

混匀, 95°C水浴 5min, 取出后用自来水或冰水冷却至室温, 取 200μL 澄清液体于 96 孔板中, 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 $\Delta A$  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 50μL 增加到 100μL, 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:  $y = 0.0123x - 0.035$ ; x 为标准品浓度 ( $\mu\text{g}$ ), y 为 $\Delta A$ 。



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 1μg 还原性糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-1,4-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.035) \div 0.0123] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 54.2 \times (\Delta A + 0.035) \div \text{Cpr}$$

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 1μg 还原性糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-1,4-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.035) \div 0.0123] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 54.2 \times (\Delta A + 0.035) \div W$$

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 1μg 还原性糖定义一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-1,4-GA}(\mu\text{g}/\text{min} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.035) \div 0.0123] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.11 \times (\Delta A + 0.035)$$

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 1μg 还原性糖定义一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-1,4-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.035) \div 0.0123] \div V1 \div T = 54.2 \times (\Delta A + 0.035)$$

V---提取液体积, 1mL;

V1---样本上样体积, 50μL = 0.05mL;

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 50μL 标准品 + 150μL 试剂一 + 150μL 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 200μL 澄清液体于 96 孔板中, 在 540nm 处读取吸光值 A, 根据结果即可制作标准曲线。