

## 果聚糖水解酶（Levanase）活性测定试剂盒说明书

（微板法 48 样）

### 一、产品简介：

果聚糖水解酶（Levanase, EC 3.2.1.65）的作用有以下几点:水解果聚糖能保证能量供给,快速升高渗透压,在压力下增加低聚果糖浓度等,从而维持基质稳定来实现御寒功能。

果聚糖水解酶水解底物果聚糖产生还原性糖。利用 3,5-二硝基水杨酸测定还原糖的量,在 540nm 读取吸光值,进而得出果聚糖水解酶的活性大小。

### 二、试剂盒组分与配制：

| 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 32mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |                            |
| 试剂二  | 粉剂×1 瓶      | 4℃ 保存 | 临用前加 12mL 试剂一混匀溶解,仍 4℃ 保存。 |
| 试剂三  | 液体 15mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |                            |
| 标准品  | 粉体×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：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、果聚糖水解酶活性测定：

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!

#### 1、样本制备：

① 组织：称取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆，4℃放置 10min；12000rpm，4℃离心 5min；弃上清，留沉淀，向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀，4℃放置 10min；12000rpm，4℃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℃放置 10min；12000rpm，4℃离心 10min；留上清，弃沉淀。上清液置冰上待测。

② 细菌/培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（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】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（ $10^4$ 个）：提取液体积（mL）为 500：1 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 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℃），在 EP 管中依次加入：

| 试剂名称（ $\mu$ L）      | 测定管 | 对照管 |
|---------------------|-----|-----|
| 样本                  | 100 | 100 |
| 试剂一                 | 100 | 100 |
| 试剂二                 | 100 |     |
| 混匀，37℃准确水浴 30min 后， |     |     |
| 试剂三                 | 100 | 100 |
| 试剂二                 |     | 100 |

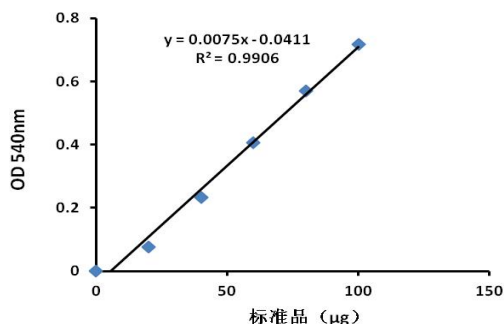
混匀，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，吸取 200μL 转移至 96 孔板中，540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$  测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。

【注】：1.若吸光值大于 1.5，可以用蒸馏水稀释样本后测定，计算公式中乘以相应稀释倍数 D。

2.若 $\Delta A$  值在零附近徘徊，可增加样本加样体积（如增至 200μL，则试剂一相应减少），或延长 37℃水浴时间（如增至 60min 或更长），则相应 V1 和 T 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程为  $y = 0.0075x - 0.0411$ ；x 为标准品质量（μg），y 为 $\Delta A$ 。



2、按照蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每小时催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0411) \div 0.0075] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 2666.7 \times (\Delta A + 0.0411) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0411) \div 0.0075] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 2666.7 \times (\Delta A + 0.0411) \div W \end{aligned}$$

4、按细菌/细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每小时催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0411) \div 0.0075] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 5.3 \times (\Delta A + 0.0411) \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每小时催化产生 1μg 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{果聚糖水解酶活力}(\mu\text{g/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0411) \div 0.0075] \div V1 \div T = 2666.7 \times (\Delta A + 0.0411)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.1mL；

T---反应时间，30 min=0.5h；

W---样本质量，g； 500---细菌或细胞总数，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 制备标准品母液(2mg/mL)：向标准品 EP 管里加入 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, 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 100μL 标准品+200μL 试剂一+100μL 试剂三，95℃水浴 10min（用封口膜缠紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀，吸取 200μL 转移至 96 孔板中，540nm 处读取吸光值 A，根据结果即可制作标准曲线。