

Pullulanase Activity Assay Kit

普鲁兰酶活性测定试剂盒说明书

货号: BN72427 | 方法: 微板法 | 规格: 96 样

一、产品简介:

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。

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。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存	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°C保存;
试剂三	液体 20mL×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、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、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!

1、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°C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。

2、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:

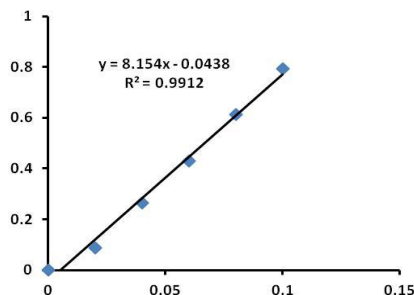
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20 (95°C煮沸 10min 的酶液)
试剂二	100	100
混匀, 50°C孵育 30min		
试剂三	100	100
混匀, 95°C水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 然后流水冷却至室温。		
蒸馏水	500	500

混匀，取出 200 μ L 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）。

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、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 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、按蛋白浓度计算：

单位定义：50 $^{\circ}$ C每毫克蛋白每分钟产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性}(\mu\text{g}/\text{min} / \text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0438) \div 8.154 \times 10^3] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 204.4 \times (\Delta A + 0.0438) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按鲜重计算：

单位定义：50 $^{\circ}$ C每克组织每分钟产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性}(\mu\text{g}/\text{min} / \text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0438) \div 8.154 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 204.4 \times (\Delta A + 0.0438) \div W \end{aligned}$$

4、按液体样本计算：

单位定义：50 $^{\circ}$ C每毫升液体样本每分钟产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{普鲁兰酶活性}(\mu\text{g}/\text{min} / \text{mL 液体}) &= [(\Delta A + 0.0438) \div 8.154 \times 10^3] \div W \times V1 \div T \\ &= 204.4 \times (\Delta A + 0.0438) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

T---反应时间，30min；

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；