

## $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶( $\beta$ -1,3-1,4-glucanase)酶活试剂盒

微板法 96 样

### 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。

### 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

### 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。

### $\beta$ -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℃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/细胞样本：

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（ $10^4$ 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℃×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	50	50
试剂一	140	150
试剂二	10	100
混匀，37℃孵育 30min		
试剂三	150	150
混匀，95℃水浴 5min，取出后用自来水或冰水冷却至室温，取 200 $\mu$ L 澄清液体于 96		

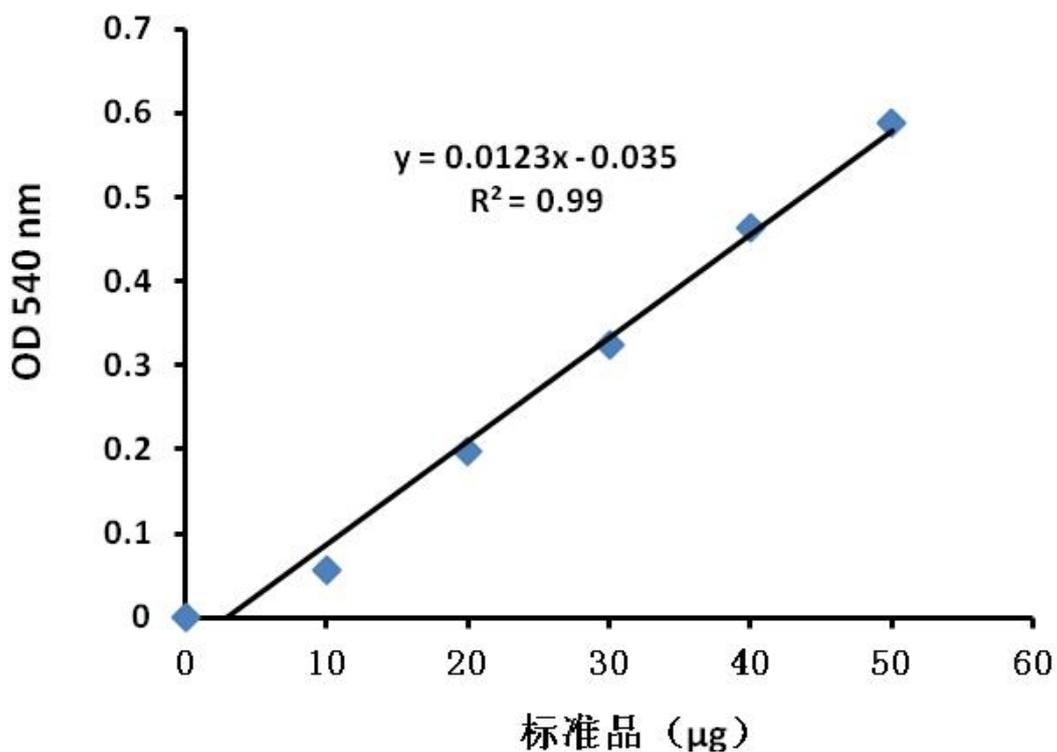
孔板中，在 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个样本做一个对照管）。

**【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 50 $\mu\text{L}$  增加到 100 $\mu\text{L}$ ，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。

**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 1 $\mu\text{g}$  还原性糖定义为一个酶活性单位。

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

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

### 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 1 $\mu\text{g}$  还原性糖定义为一个酶活性单位。

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

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

### 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 1 $\mu\text{g}$  还原性糖定义一个酶活性单位。

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

$$A + 0.035)$$

### 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 1 $\mu\text{g}$  还原性糖定义一个酶活性单位。

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

V---提取液体积，1mL； V1---样本上样体积，50 $\mu\text{L}$  =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 $^{\circ}\text{C}$ 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 50 $\mu\text{L}$  标准品+150 $\mu\text{L}$  试剂一+150 $\mu\text{L}$  试剂三，混匀 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5min，取出后用

自来水或冰水冷却至室温，取 200 $\mu$ L 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。