

β-甘露糖苷酶 (β-Mannosidase,β-Man) 活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10431F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍：

β-甘露糖苷酶 (EC 3.2.1.25, β-Man) 属于外切水解酶类, 又称 β-D-甘露糖苷甘露糖水解酶、外切-β-D-甘露聚糖酶, 它能够催化结合甘露寡聚糖末端非还原性的 β-1, 4-D-糖苷键, 并切下一个甘露糖分子, 是甘露聚糖完全降解所必需的水解酶。

β-甘露糖苷酶 (β-Man) 催化对硝基苯酚-β-D-吡喃甘露糖苷产生对硝基苯酚 (PNP), 该产物在 405nm 处有特征吸收峰, 通过测定 405nm 光吸收增加速率, 即可计算β-甘露糖苷酶活性。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本的制备:

① 组织样本: 取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃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 比例提取。

② 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 细菌或细胞: 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 500~1000: 1 的比例提取。

2、检测步骤:

① 分光光度计预热 30min (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。

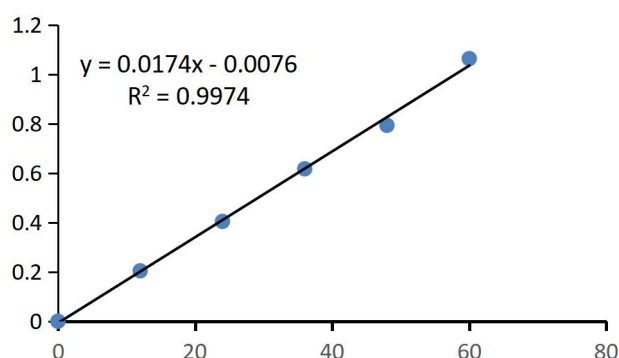
② 所有试剂解冻至室温 (25℃) 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	30	30
试剂一	40	
试剂二	300	340
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	350	350
混匀, 5min 后立即于 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定管需设一个对照管)。		

- 【注】：1. 若 ΔA 在零附近, 可增加样本加样体积 V_1 (即加样量增加至 60μL, 则试剂二相应减少), 或延长保温时间 T (如: 由 30min 延长至 60min 或更长), 重新调整的 V_1 和 T 需代入计算公式重新计算。
2. 若 A 测定值大于 1.5, 可对样本上清液用蒸馏水稀释, 则稀释倍数 D 代入公式计算。

五、结果计算:

- 1、标准曲线方程: $y = 0.0174x - 0.0076$; x 为标准品摩尔质量 (nmol), y 为 ΔA 。



- 2、按样本质量计算:

酶活定义: 每克组织每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚(PNP)为一个酶活单位。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0076) \div 0.0174 \div (V_1 \div V \times W) \div T \times D \\ = 63.9 \times (\Delta A + 0.0076) \div W \times D$$

- 3、按蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克蛋白每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚(PNP)为一个酶活单位。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A + 0.0076) \div 0.0174 \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \times D \\ = 63.9 \times (\Delta A + 0.0076) \div C_{\text{pr}} \times D$$

- 4、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚(PNP)为一个酶活单位。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A + 0.0076) \div 0.0174 \div V_1 \div T \times D \\ = 63.9 \times (\Delta A + 0.0076) \times D$$

- 5、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚(PNP)为一酶活单位。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = (\Delta A + 0.0076) \div 0.0174 \div (V_1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \times D \\ = 63.9 \times (\Delta A + 0.0076) \div \text{细胞数量} \times D$$

V ---加入提取液体积, 1mL;

V_1 ---加入反应体系中样本体积, $30\mu\text{L} = 0.03\text{mL}$;

W---样本质量, g; 500---细胞或细菌总数, 万;
 T---反应时间, 30min; 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 标曲为非必做实验, 用户可根据实验需求制作标曲, 亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液 (10 μ mol/mL) : 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水。
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 200uL, 加入 800uL 蒸馏水, 混匀得到 2 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。
在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	30	0
蒸馏水	0	30
试剂二	340	340
试剂三	350	350
混匀转移全部液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		