

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

(货号: BP10431W 微板法 48 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 60mL×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 蒸馏水超声溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 10mL×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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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 酶标仪预热 30min (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 405nm。

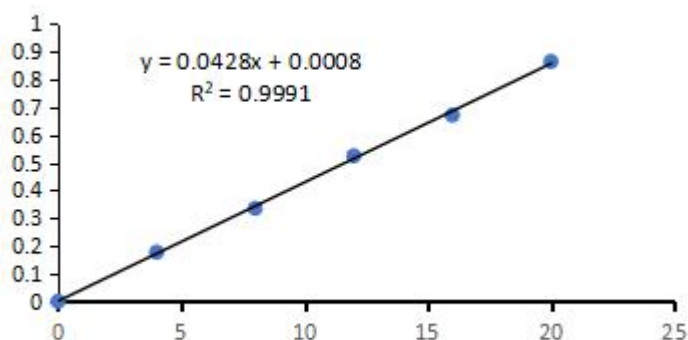
② 所有试剂解冻至室温 (25℃) 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	20	
试剂二	70	90
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	100	100
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 40μL, 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: $y = 0.0428x + 0.0008$; x 为标准品摩尔质量 (nmol), y 为 ΔA 。



2、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。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = (\Delta A - 0.0008) \div 0.0428 \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \times D \\ = 77.88 \times (\Delta A - 0.0008) \div C_{\text{pr}} \times D$$

3、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。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0008) \div 0.0428 \div (V_1 \div V \times W) \div T \times D \\ = 77.88 \times (\Delta A - 0.0008) \div W \times D$$

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。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol/min/mL}) = (\Delta A - 0.0008) \div 0.0428 \div V_1 \div T \times D \\ = 77.88 \times (\Delta A - 0.0008) \times D$$

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。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = (\Delta A - 0.0008) \div 0.0428 \div (V_1 \div V \times 500) \div T \times D \\ = 0.156 \times (\Delta A - 0.0008) \times D$$

V ---加入提取液体积, 1mL;

V_1 ---加入反应体系中样本体积, 10μL=0.01mL;

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	0
蒸馏水	0	10
试剂二	90	90
试剂三	100	100
混匀, 5min 后立即于 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{0 浓度}}$ 。		