

β-甘露聚糖酶 (β-mannanase) 活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10434F 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

β-甘露聚糖酶 (EC 3.2.1.78) 广泛存在于动植物和微生物中。用于饲料工业, 不仅可以消除饲料中的抗营养因子甘露聚糖, 提高饲料利用率, 还能促进有益菌的增殖, 提高动物免疫功能。

β-甘露聚糖酶水解甘露聚糖产生寡糖和单糖, 还原性寡糖和单糖在沸水浴中与3,5-二硝基水杨酸 (DNS试剂) 反应显色反应, 该显色物质在540nm下有最大吸收峰, 通过测定还原性糖的生成量进而计算出β-甘露聚糖酶的酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

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℃避光保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉剂 2 瓶	4℃避光保存	每瓶: 1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加 5mL 试剂一, 可超声至溶解, 溶解后 4℃保存。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 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、样本提取:

- 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 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。
- ③ 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 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

- ① 分光光度计预热 30min 以上 (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。

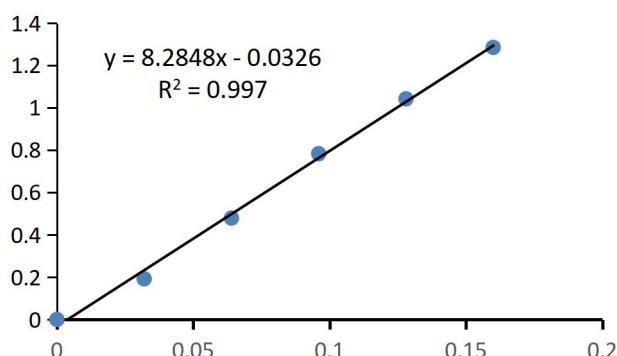
② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	80	80
试剂二	80	80
试剂三		200
37℃孵育 30min。		
试剂三	200	
混匀，95℃水浴 5min，取出后用自来水或冰水冷却至室温，		
蒸馏水	640	640
取 800μL 澄清液体于 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）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 ΔA 差值低于 0.01，可增加样本取样质量 W 或延长孵育时间 T（如增至 60min）或增加样本加样体积 V1（如增至 120μL，则试剂二相应减少），则改变后的 W 和 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 8.2848x - 0.0326$ ；x 为标准品质量（mg），y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时催化底物产生 1μmol 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\beta\text{-甘露聚糖酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0326) \div 8.2848 \div Mr \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 16.71 \times (\Delta A + 0.0326) \div W$$

3、按照蛋白浓度计算：

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

$$\beta\text{-甘露聚糖酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0326) \div 8.2848 \div Mr \times 10^3] \div (Cpr \times V1) \div T$$

$$= 16.71 \times (\Delta A + 0.0326) \div Cpr$$

4、按液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每小时催化底物产生 1μmol 还原糖定义为一个酶活力单位。

$$\beta\text{-甘露聚糖酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0326) \div 8.2848 \div Mr \times 10^3] \div V1 \div T = 16.71 \times (\Delta A + 0.0326)$$

5、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底物产生 1nmol 还原糖定为一个酶活力单位。

$$\beta\text{-甘露聚糖酶活力}(\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0326) \div 8.2848 \div Mr \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 33.42 \times (\Delta A + 0.0326)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;
 T---反应时间, 30 min=0.5 小时;
 500---细菌或细胞总数, 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;

V1---加入样本体积, 0.08mL;
 W---样本质量, g;
 Mr---180.55, 标准品为甘露糖;

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（4mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（需在两天内用且-20℃保存）
- 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. mg/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 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 2.mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/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 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	80	80
蒸馏水	80	80
试剂三	200	200
混匀，95℃水浴 5min，取出后用自来水或冰水冷却至室温，		
蒸馏水	640	640
取 800μL 澄清液体于 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中，在 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		