

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

(货号: G0721F 分光法 24 样)

一、产品简介：

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂×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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、低温离心机、天平、研钵、冰和蒸馏水。

四、β-甘露糖苷酶 (β-Man) 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°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 比例提取。

② 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°C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。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min, 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) 在 EP 管中依次加入:

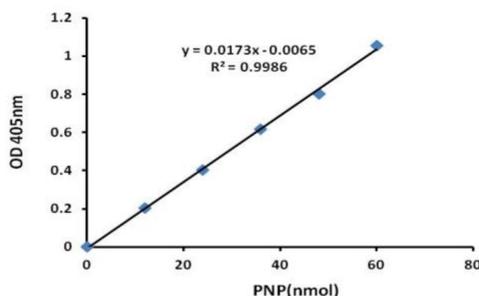
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	30	30
试剂一	40	
试剂二	300	340
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	350	350

混匀,5min 后立即于 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A=A$
测定-A 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 $60\mu\text{L}$, 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: $y = 0.0173x - 0.0065$; 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。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A + 0.0065) \div 0.0173 \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \times D$$

$$= 64.23 \times (\Delta A + 0.0065) \div \text{Cpr} \times D$$

- 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。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0065) \div 0.0173 \div (V_1 \div V \times W) \div T \times D$$

$$= 64.23 \times (\Delta A + 0.0065) \div W \times D$$

- 4、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。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = (\Delta A + 0.0065) \div 0.0173 \div (V_1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \times D$$

$$= 64.23 \times (\Delta A + 0.0065) \div \text{细胞数量} \times D$$

- 5、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。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A + 0.0065) \div 0.0173 \div V_1 \div T \times D$$

$$= 64.23 \times (\Delta A + 0.0065) \times D$$

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, 500 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 制备标准品母液 ($10\mu\text{mol}/\text{mL}$): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, $2\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管中依次加入: $30\mu\text{L}$ 标准品+ $340\mu\text{L}$ 试剂二+ $350\mu\text{L}$ 试剂三, 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, 根据结果制作标准曲线。