

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

(货号: ADS-W-MAN002 微板法 48 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 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 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 10mL×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:

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min, 调节波长至 405nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (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, $\Delta A = A$ 测定 - A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

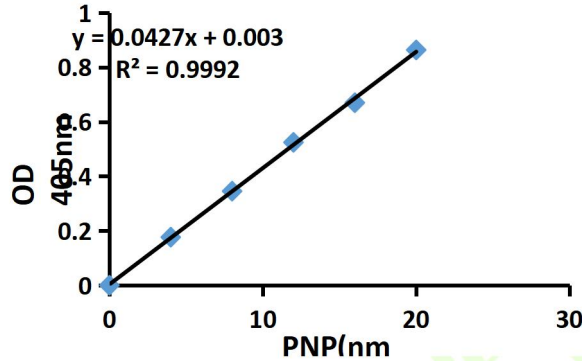
【注】: 1. 若  $\Delta A$  在零附近, 可增加样本加样体积  $V_1$  (即加样量增加至 40μL, 则试剂二相应减少), 或延长保

温时间 T (如: 由 30min 延长至 60min 或更长), 重新调整的 V1 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:  $y = 0.0427x + 0.003$ ; x 为标准品摩尔质量 (nmol), y 为  $\Delta A$ 。



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。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.003) \div 0.0427 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D$$

$$= 78.06 \times (\Delta A - 0.003) \div \text{Cpr} \times D$$

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。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.003) \div 0.0427 \div (V1 \div V \times W) \div T \times D$$

$$= 78.06 \times (\Delta A - 0.003) \div W \times D$$

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。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = (\Delta A - 0.003) \div 0.0427 \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \times D$$

$$= 78.06 \times (\Delta A - 0.003) \div \text{细胞数量} \times D$$

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。

$$\beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.003) \div 0.0427 \div V1 \div T \times D$$

$$= 78.06 \times (\Delta A - 0.003) \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积,  $10\mu\text{L} = 0.01\text{mL}$ ;

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 96 孔板中依次加入:  $10\mu\text{L}$  标准品+ $90\mu\text{L}$  试剂二+ $100\mu\text{L}$  试剂三, 混匀于 405nm 下读取吸光值, 根据结果制作标准曲线。