

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

(货号: ADS-F-MAN002 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 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, $\Delta A=A$		

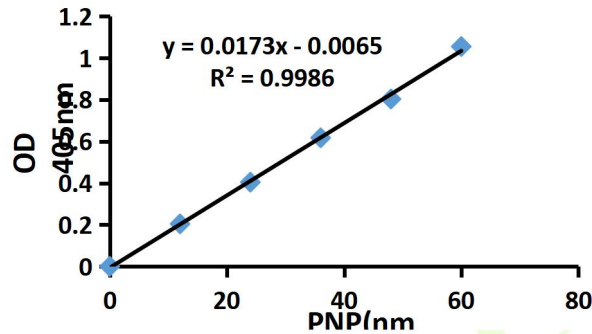
测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。

【注】：1. 若 $\Delta A$  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  $30\text{min}$  延长至  $60\text{min}$  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（ $\text{nmol}$ ）， $y$  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  $1 \text{ nmol}$  对硝基苯酚(PNP)为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0065) \div 0.0173 \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 64.23 \times (\Delta A + 0.0065) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

3、按样本质量计算：

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

$$\begin{aligned} \beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0065) \div 0.0173 \div (V_1 \div V \times W) \div T \times D \\ &= 64.23 \times (\Delta A + 0.0065) \div W \times D \end{aligned}$$

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  $1 \text{ nmol}$  对硝基苯酚(PNP)为一酶活单位。

$$\begin{aligned} \beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A + 0.0065) \div 0.0173 \div (V_1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \times D \\ &= 64.23 \times (\Delta A + 0.0065) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

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

$$\begin{aligned} \beta\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A + 0.0065) \div 0.0173 \div V_1 \div T \times D \\ &= 64.23 \times (\Delta A + 0.0065) \times D \end{aligned}$$

$V$ ---加入提取液体积， $1\text{mL}$ ；       $V_1$ ---加入反应体系中样本体积， $30\mu\text{L}=0.03\text{mL}$ ；

$W$ ---样本质量， $\text{g}$ ；       $500$ ---细胞或细菌总数， $500$  万；

$T$ ---反应时间， $30\text{min}$ ；       $D$ ---稀释倍数，未稀释即为  $1$ ；

$\text{Cpr}$ ---样本蛋白质浓度， $\text{mg}/\text{mL}$ ，建议使用本公司的  $\text{BCA}$  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  $1\text{mL}$  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  $1\text{mL}$  玻璃比色皿（光径  $1\text{cm}$ ）中，于  $405\text{nm}$  下读取吸光值，根据结果制作标准曲线。