β-甘露聚糖酶（β-mannanase）活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-MAN003　微板法 96 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得出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 110mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 20mL×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 9mL 试剂一，可超声至溶解，溶解后 4℃保存。
试剂三	液体 40mL×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）、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（10^4 个）：提取液体积（mL）为 500：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 540nm。

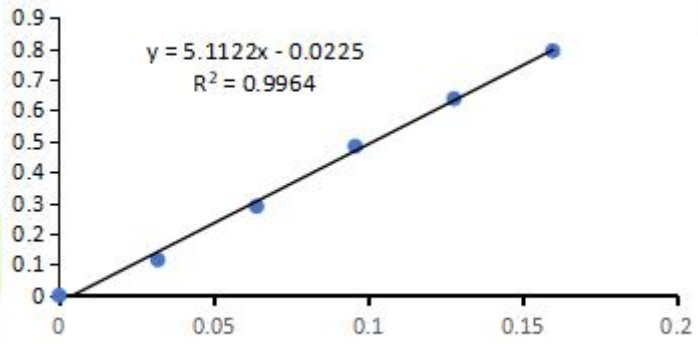
② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

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 200μL 澄清液体于 96 孔板中，在 540nm 处读取吸光值 A，ΔA=A 测定管-A 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 = 5.1122x - 0.0225；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。

β-甘露聚糖酶活力(μmol/h/g 鲜重)=[(ΔA+0.0225)÷5.1122÷Mr×10^3]÷(W×V1÷V)÷T

=27.08×(ΔA+0.0225)÷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。

β-甘露聚糖酶活力(μmol/h/mg prot)=[(ΔA+0.0225)÷5.1122÷Mr×10^3]÷(Cpr×V1)÷T

=27.08×(ΔA+0.0225) ÷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。

β-甘露聚糖酶活力(μmol/h/mL)=[(ΔA+0.0225)÷5.1122÷Mr×10^3]÷V1÷T=27.08×(ΔA+0.0225)

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。

β-甘露聚糖酶活力(nmol/h/10^4 cell)=[(ΔA+0.0225)÷5.1122÷Mr×10^6]÷(500×V1÷V)÷T

=54.17×(ΔA+0.0225)

V---加入提取液体积，1 mL；　　V1---加入样本体积，0.08mL；

T---反应时间，30 min=0.5 小时；　　W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，万；　　Mr---180.55，标准品为甘露糖；

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　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	0
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 200μL 澄清液体于 96 孔板中，在 540nm 处读取吸光值 A，△A=A 标准-A0 浓度。		