

β-甘露聚糖酶 (β-mannanase) 活性测定试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介:

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	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 每瓶加 5mL 试剂一, 可超声至溶解, 溶解后 4°C保存。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体×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)、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、β-甘露聚糖酶活性测定:

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、样本制备:

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°C放置 10min; 12000rpm, 4°C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°C放置 10min; 12000rpm, 4°C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°C放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 10min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。

② 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°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 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500: 1 的比例进行提

③ 液体样本: 若是澄清液体, 直接检测, 若液体样本浑浊, 需 4°C×12000rpm, 离心 10min,

取上清液检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 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:

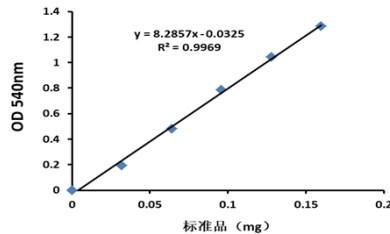
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80

试剂二	80	80
试剂三		200
37°C 孵育 30min。		
试剂三	200	
混匀, 95°C 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, 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 $y = 8.2857x - 0.0325$; x 为标准品质量 (mg), y 为 ΔA。



2、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。

$$\beta\text{-甘露聚糖酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0325) \div 8.2857 \div Mr \times 10^3] \div (Cpr \times V1) \div T$$

$$= 16.8 \times (\Delta A + 0.0325) \div Cpr$$

3、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。

$$\beta\text{-甘露聚糖酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0325) \div 8.2857 \div Mr \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 16.8 \times (\Delta A + 0.0325) \div W$$

4、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。

$$\beta\text{-甘露聚糖酶活力}(\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0325) \div 8.2857 \div Mr \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 33.42 \times (\Delta A + 0.0325)$$

5、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。

$$\beta\text{-甘露聚糖酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0325) \div 8.2857 \div Mr \times 10^3] \div V1 \div T = 16.8 \times (\Delta A + 0.0325)$$

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 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°C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2. mg/mL。
- 3 按照 80μL 标准品+80μL 蒸馏水+200μL 试剂三, 95°C 水浴 5min, 取出后用自来水或冰水冷却至室温, 再加 640μL 蒸馏水混匀, 再分别取出 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，根据结果即可制作标准曲线。
