

可见分光光度法 50 管/48 样>

注

意：正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

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出 β -甘露聚糖酶的酶活性大小。

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、乙醇、冰和蒸馏水。

试剂盒组分与配制：

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 10mL ×2 瓶，4°C保存；

β -甘露聚糖酶活性测定：

一、样本制备：

1、组织：

1. 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；离心 5min（12,000rpm 4°C）；弃上清，留沉淀，

2. 向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀，4°C放置 10min；离心 5min（12,000rpm 4°C）；

弃上清，留沉淀。

3. 再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液，涡旋混匀，4°C放置 10min；离心 10min

（12,000rpm 4°C）；留上清，弃沉淀。上清液置冰上待测。

2、细菌/培养细胞：

1. 先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；

2. 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）；

3. 离心 10min（12,000rpm 4°C），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。

3、液体样本：

a) 若是澄清液体，直接检测；

b) 若液体样本浑浊，需离心 10min（12,000rpm 4℃），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。

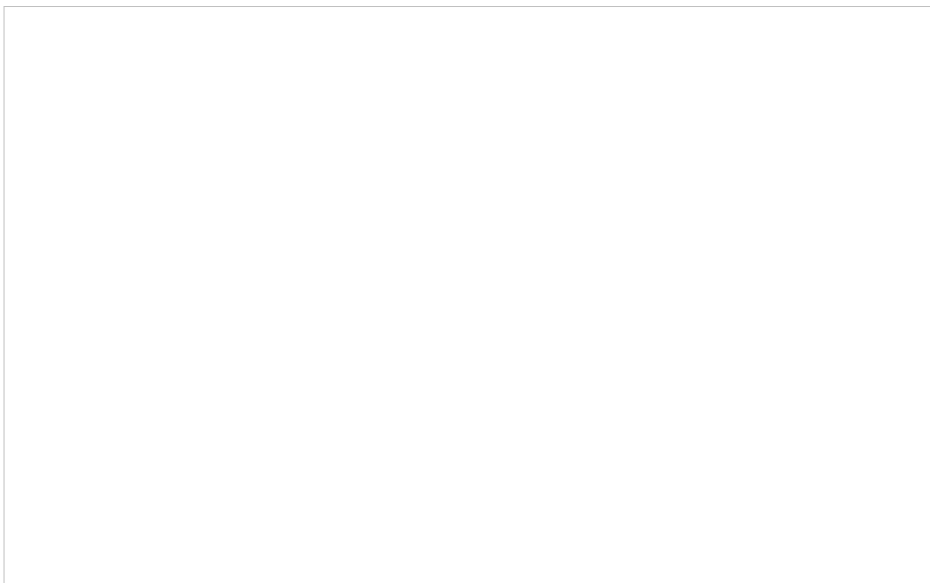
2、所有试剂解冻至室温（25℃），

3、在 EP 管中依次加入：



【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 120 μ L，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。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 1 μ mol 还原糖定义为一个酶活力单位。

β -甘露聚糖酶活力(μ mol/h/mg prot)=[$(\Delta A+0.0325)\div 8.2857\div Mr\times 10$

$$] \div (\text{Cpr} \times \text{V1}) \div \text{T} = 16.8 \times (\Delta\text{A} + 0.0325) \div \text{Cpr}$$

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 1 μmol 还原糖定义为一个酶活力单位。

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

3

$$] \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \div \text{T} = 16.8 \times (\Delta\text{A} + 0.0325) \div \text{W}$$

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 1 nmol 还原糖定为一个酶活力单位。

β -甘露聚糖酶活力(nmol/h/10

$$4\text{cell}) = [(\Delta\text{A} + 0.0325) \div 8.2857 \div \text{Mr} \times 10$$

6

$$] \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \div \text{T} = 16.8 \times (\Delta\text{A} + 0.0325)$$

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 1 nmol 还原糖定义为一个酶活力单位。

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

6

$$] \div \text{V1} \div \text{T} = 16.8 \times (\Delta\text{A} + 0.0325)$$

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;

预实验的意义:

比色法检测试剂盒预实验非常重要

1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达

处理的样本);

2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;

3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;

4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;

5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本

稀释比例。