

α -甘露糖苷酶(α -man)活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：BC5040

规格：50T/24S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	3mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前每支加入 1mL 试剂四溶解，溶解后的试剂在-20°C分装保存，可以保存 4 周。
- 2、标准品：5mmol/L 的对硝基苯酚标准液。

产品说明：

α -man 分布广泛、种类繁多，在真核生物胞质、内质网、高尔基体、溶酶体中都有发现，不同种类、功能的 α -man 共同参与 N-聚糖的修饰过程。

α -man 和特定底物发生反应，其生成物在 405nm 处有特征吸收峰，根据吸光度的变化率可计算出 α -man 活性。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、恒温培养箱/水浴锅、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、匀浆器/研钵、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后 12000 g，4°C，离心 10 min，取上清置于冰上待测。

2、细胞或细菌：先收集细胞或细菌到离心管内，离心后弃上清；按照细胞或细菌数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万个细胞或细菌加入 1 mL 提取液）进行提取，冰浴超声波破碎细胞或细菌（功率 200 W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3 min）；然后 12000 g，4°C，离心 10 min，取上清置于冰上待测。

3、液体：直接检测。若有浑浊可以离心后测定

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 405 nm，蒸馏水调零。

2、将 5mmol/L 的对硝基苯酚标准液用蒸馏水稀释为 0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.01、0.005mmol/L 的标准溶液备用。

3、操作表：(在 1.5 mL 离心管中)

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	125	125	-	-
标准溶液	-	-	125	-
试剂一	550	625	625	625
试剂二	75	-	-	-
蒸馏水	-	-	-	125
混匀, 37°C水浴或恒温培养箱中准确反应 10 min				
试剂三	250	250	250	250
混匀, 测定 405 nm 处吸光值 A, 分别记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每个测定管需设一个对照管, 标准曲线、空白管只需检测 1-2 次。				

三、α-甘露糖苷酶(α-man)活性计算

1、标准曲线的绘制:

以各个标准溶液的浓度为 x 轴, 其对应的 ΔA 标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y = kx + b$, 将 ΔA 带入方程得到 x (mmol/L, 即 $\mu\text{mol/mL}$)。

2、α-甘露糖苷酶活性的计算:

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义: 每 mg 蛋白每分钟产生 1 μmol 对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F = x \times 0.1 \div C_{\text{pr}} \times F$$

(2) 按样本质量计算

酶活定义: 每 g 样本每分钟产生 1 μmol 对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times F = x \times 0.1 \div W \times F$$

(3) 按照细胞或细菌数量计算

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟产生 1 μmol 对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-甘露糖苷酶活 (U}/10^4 \text{ cell)} &= x \times V_{\text{样}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div \text{细胞数量 (万个)} \div T \times F \\ &= x \times 0.1 \div \text{细胞数量 (万个)} \times F \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义: 每 mL 样本每分钟产生 1 μmol 对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活 (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times F = x \times 0.1 \times F$$

V 提取: 提取液体积, 1 mL; V 样: 加入的样本体积, 0.125 mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL, 蛋白浓度自行测定; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 10 min; F: 稀释倍数。

注意事项:

1、如果测定吸光值 $A > 1.5$ 或 $\Delta A > 1$, 建议稀释样本后再测定, 计算公式中乘以稀释倍数; 如果测定吸光值较低或接近空白 OD 值, 建议增加样本量后再进行测定。

实验实例：

1、称取 0.1 g 兔子肝脏组织，加入 1 mL 提取液，冰浴匀浆，12000 g，4°C条件下离心 10 min；取上清置于冰上待测。使用 1mL 玻璃比色皿按照测定步骤操作，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.404 - 0.309 = 0.095$ ，标准曲线 $y = 2.0294x + 0.0092$ ，计算 $x = 0.0422$ ，按公式计算活性：

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶酶活 (U/g 质量)} = x \times 0.1 \div W \times F = 0.0422 \text{ U/g 质量}$$

2、称取 0.1 g 草莓果肉，加入 1 mL 提取液，冰浴匀浆，12000 g，4°C条件下离心 10 min；取上清置于冰上待测。使用 1mL 玻璃比色皿按照测定步骤操作，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.113 - 0.091 = 0.022$ ，标准曲线 $y = 2.0294x + 0.0092$ ，计算 $x = 0.0063$ ，按公式计算活性：

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶酶活 (U/g 质量)} = x \times 0.1 \div W \times F = 0.0063 \text{ U/g 质量}$$

相关系列产品：

BC0360/ BC0365 β -1,3葡聚糖酶(β -1,3-GA)活性检测试剂盒

BC2550/ BC2555 α -葡萄糖苷酶(α -GC)活性检测试剂盒

BC2560/ BC2565 β -葡萄糖苷酶(β -GC)活性检测试剂盒

BC2570/ BC2575 α -半乳糖苷酶(α -GAL)活性检测试剂盒

BC2580/ BC2585 β -半乳糖苷酶(β -GAL)活性检测试剂盒

