



α -甘露糖苷酶(α -man)活性检测试剂盒(微量法)

中文名称： α -甘露糖苷酶(α -man)活性检测试剂盒

英文名称： α -Mannosidase(α -man)Activity Assay kit

产品推荐：若使用 96 孔板测定，需使用 96 孔 UV 板

产品包装：盒装

产品规格：100T/48S

储存条件： -20°C

检测方法：微量法

有效期：6 个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存
试剂二	粉剂×2 支	-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存
试剂四	1.5mL×1 支	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前每支加入 0.5mL 试剂四溶解，溶解后的试剂在-20 $^{\circ}\text{C}$ 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：

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、恒温培养箱/水浴锅、匀浆器/研钵、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量）

- 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 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后 12000g, 4°C,离心 10min, 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（10⁴ 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 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，冰浴超声波破碎细胞或细菌（功率 200W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 15000g, 4°C,离心 10min, 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/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、将 5mmol/L 的对-硝基苯酚标准液用蒸馏水稀释为 0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.0195、0.01mmol/L 的标准溶液备用。



3、操作表：(在 1.5mL 离心管或者 96 孔板中)

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	25	25	-	-
试剂一	110	125	125	125
试剂二	15	-	-	-
标准溶液	-	-	25	-
蒸馏水	-	-	-	25
混匀，37°C水浴或恒温培养箱中准确反应 10 min				
试剂三	50	50	50	50
混匀，吸取 200μL 于微量玻璃比色皿或 96 孔板中，测定 405nm 处吸光值 A，分别记为 A 对照管、A 测定管、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、-甘露糖苷酶活性计算

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。

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

(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。

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

(3)按照细胞或细菌数量计算

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟产生 1 μmol 对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。



$$\alpha\text{-甘露糖苷酶酶活(U/104cell)}=x \times V_{\text{样}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times F$$
$$=x \times 0.1 \div \text{细胞数量(万个)} \times F$$

(4)按液体体积计算

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

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

V 提取：提取液体积，1mL；V 样：加入的样本体积，0.025mL；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，10min；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 0.1g 兔子肝脏组织，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12000g，4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10min；取上清置于冰上待测。使用 96 孔板按照测定步骤操作，计算 $\Delta A=A_{\text{测定管}}-A_{\text{对照管}}=0.404-0.309=0.095$ ，标准曲线 $y=1.3642x+0.0037$ ，计算 $x=0.0669$ ，按公式计算活性：

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶酶活(U/g 质量)}=x \times 0.1 \div W \times F=0.0669\text{U/g 质量}$$

2、称取 0.1g 绿萝叶片，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12000g，4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10min；取上清置于冰上待测。使用 96 孔板按照测定步骤操作，计算 $\Delta A=A_{\text{测定管}}-A_{\text{对照管}}=0.179-0.159=0.02$ ，标准曲线 $y=1.3642x+0.0037$ ，计算 $x=0.0119$ ，按公式计算活性：

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶酶活(U/g 质量)}=x \times 0.1 \div W \times F=0.0119\text{U/g 质量}$$

3、用 0.025mL 牛血清按操作步骤进行实验，使用 96 孔板按照测定步骤操作，计算 $\Delta A=A_{\text{测定管}}-A_{\text{对照管}}=0.107-0.086=0.021$ ，标准曲线 $y=1.3642x+0.0037$ ，计算 $x=0.0127$ ，按公式计算活性：



$$\alpha\text{-甘露糖苷酶酶活(U/g 质量)}=x \times 0.1 \div W \times F=0.0127\text{U/mL}$$