



## α-甘露糖苷酶(α-man)活性检测试剂盒可见分光光度法

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

产品包装：盒装

产品规格：50T/24S

储存条件：-20℃

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 50mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	粉剂 20mL×1 瓶	-20℃保存
试剂四	液体 3mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	-20℃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℃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  $\alpha$ -man 共同参与 N-聚糖的修饰过程。

$\alpha$ -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  $\alpha$ -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)

**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<sup>4</sup> 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				
试剂二	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、“-甘露糖苷酶(-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  $\Delta A$  标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程  $y = kx + b$ , 将  $\Delta A$  带入方程得到 x (mmol/L, 即  $\mu\text{mol/mL}$ )。

2、 $\alpha$ -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  $\mu\text{mol}$  对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。

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

(2) 按样本质量计算

酶活定义: 每 g 样本每分钟产生 1  $\mu\text{mol}$  对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。

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

(3) 按照细胞或细菌数量计算

酶活定义: 每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟产生 1  $\mu\text{mol}$  对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。

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

#### (4) 按液体体积计算

酶活定义：每 mL 样本每分钟产生 1  $\mu\text{mol}$  对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。

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

$V_{\text{提取}}$ ：提取液体积，1 mL； $V_{\text{样}}$ ：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：

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 1 mL 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：

$\alpha$ -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 1 mL 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：

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