

α -甘露糖苷酶 (α -man) 活性检测试剂盒 (可见分光光度法)

产品货号: BA1942

产品规格: 50T/24S

产品简介:

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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体50mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×2支	-20℃
试剂三	液体30mL×1瓶	2-8℃
试剂四	液体30mL×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

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。

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、1mL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0.1g组织,加入1mL提取液)进行冰浴匀浆,然后12000g,4℃,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(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1mL提取液)进行提取,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12000g,4℃,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. 分光光度计预热30min以上,调节波长至405nm,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1.5mL离心管中):



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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℃水浴或恒温培养箱中准确反应10min				
试剂三	250	250	250	250
混匀, 测定405nm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 $1\mu\text{mol}$ 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 10^4 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。

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

(4) 按液体体积计算

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

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

V提取: 提取液体积, 1mL; V样: 加入的样本体积, 0.125mL; 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:

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, 12000 g, 4℃条件下离心10min; 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0.1g草莓果肉, 加入1mL提取液, 冰浴匀浆, 12000 g, 4℃条件下离心10min; 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:

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



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com