

α -甘露糖苷酶 (α -Mannosidase, α -Man) 活性测定试剂盒说明书

(微板法 48 样)

一、产品简介：

α -甘露糖苷酶 (EC 3.2.1.24, α -Man) 是参与植物体内 N-聚糖加工的关键酶之一。是植物细胞壁糖蛋白代谢过程中的关键性糖苷酶, 在分生组织的生长、果实的成熟软化、种子的萌发等生理进程中起重要作用。

α -甘露糖苷酶 (α -Man) 催化对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖苷产生对硝基苯酚 (PNP), 该产物在 405nm 处有特征吸收峰, 通过测定 405nm 光吸收增加速率, 即可计算 α -甘露糖苷酶活性。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水超声溶解备用。
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温离心机、天平、研钵、冰和蒸馏水。

四、 α -甘露糖苷酶 (α -Man) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本的制备:

① 组织样本: 取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 比例提取。

② 细菌或细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 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); 12000rpm, 4°C离心 10min, 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 500~1000: 1 的比例提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min, 调节波长至 405nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	20	
试剂二	70	90
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	100	100
混匀, 5min 后立即于 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A=A$		

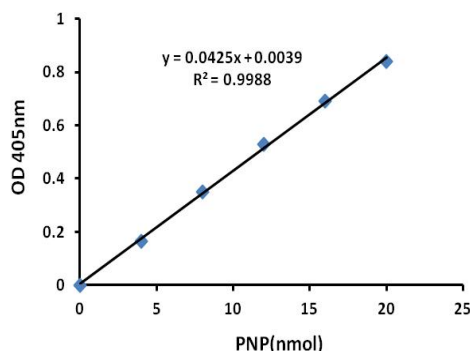
测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。

【注】：1. 若 ΔA 在零附近，可增加样本加样体积 V_1 （即加样量增加至 $40\mu\text{L}$ ，则试剂二相应减少），或延长保温时间 T （如：由 30min 延长至 60min 或更长），重新调整的 V_1 和 T 需代入计算公式重新计算。

2. 若 A 测定值大于 1.5 ，可对样本上清液用蒸馏水稀释，则稀释倍数 D 代入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0425x + 0.0039$ ； x 为标准品摩尔质量（ nmol ）， y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚(PNP)为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0039) \div 0.0425 \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 78.43 \times (\Delta A - 0.0039) \div \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

3、按样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚(PNP)为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0039) \div 0.0425 \div (V_1 \div V \times W) \div T \times D \\ &= 78.43 \times (\Delta A - 0.0039) \div W \times D\end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚(PNP)为一酶活单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A - 0.0039) \div 0.0425 \div (V_1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \times D \\ &= 78.43 \times (\Delta A - 0.0039) \div \text{细胞数量} \times D\end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚(PNP)为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0039) \div 0.0425 \div V_1 \div T \times D \\ &= 78.43 \times (\Delta A - 0.0039) \times D\end{aligned}$$

V ---加入提取液体积， 1mL ；

V_1 ---加入反应体系中样本体积， $10\mu\text{L}=0.01\text{mL}$ ；

W ---样本质量， g ；

500 ---细胞或细菌总数， 500 万；

T ---反应时间， 30min ；

D ---稀释倍数，未稀释即为 1 ；

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；

附：标准曲线制作过程：

1 制备标准品母液（ $10\mu\text{mol}/\text{mL}$ ）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水。

2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品： $0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 在 96 孔板中依次加入： $10\mu\text{L}$ 标准品+ $90\mu\text{L}$ 试剂二+ $100\mu\text{L}$ 试剂三，混匀于 405nm 下读取吸光值，根据结果制作标准曲线。