

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

(货号: BP10430F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水超声溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

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℃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 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

③ 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℃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。

2、检测步骤：

① 分光光度计预热 30min（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）在 EP 管中依次加入：

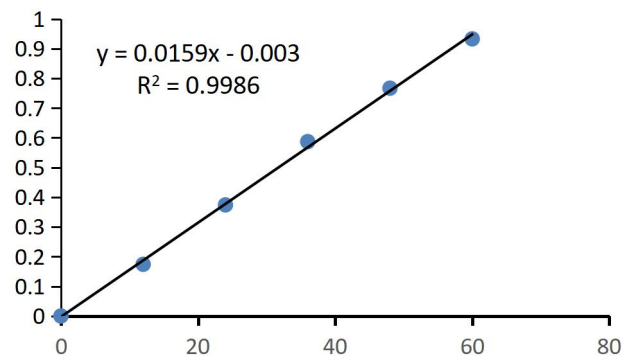
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	30	30
试剂一	40	
试剂二	300	340
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	350	350
混匀, 5min 后吸取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 立即于 405nm 下读取吸光值 A, ΔA=A 测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

【注】: 1. 若ΔA 在零附近, 可增加样本加样体积 V1 (即加样量增加至 60μL, 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 V1 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: $y = 0.0159x - 0.003$; 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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = (\Delta A + 0.003) \div 0.0159 \div (V1 \times Cpr) \div T \times D \\ = 69.9 \times (\Delta A + 0.003) \div Cpr \times D$$

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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.003) \div 0.0159 \div (V1 \div V \times W) \div T \times D \\ = 69.9 \times (\Delta A + 0.003) \div W \times D$$

4、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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol/min/mL}) = (\Delta A + 0.003) \div 0.0159 \div V1 \div T \times D = 69.9 \times (\Delta A + 0.003) \times D$$

5、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚(PNP)为一酶活单位。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol/min/10}^4\text{cell}) = (\Delta A + 0.003) \div 0.0159 \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \times D \\ = 69.9 \times (\Delta A + 0.003) \div \text{细胞数量} \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 30μL=0.03mL;

W---样本质量, g;

500---细胞或细菌总数, 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 标曲为非必做实验, 用户可根据实验需求制作标曲, 亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液 (10 μ mol/mL) : 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水。
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 200uL, 加入 800uL 蒸馏水, 混匀得到 2 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。
在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	30	30
试剂二	340	340
试剂三	350	350
混匀转移全部液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		