

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

(货号: BP10430W 微板法 48 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 60mL×1 瓶 | 4℃ 保存   |                                                                                 |
| 试剂一  | 粉剂 1 支      | 4℃ 避光保存 | 1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底；<br>2. 加入 1.1mL 蒸馏水超声溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂二  | 液体 10mL×1 瓶 | 4℃ 保存   |                                                                                 |
| 试剂三  | 液体 10mL×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；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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<sup>4</sup> 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例提取。

#### 2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min (等仪器过自检程序亦可)，调节波长至 405nm。

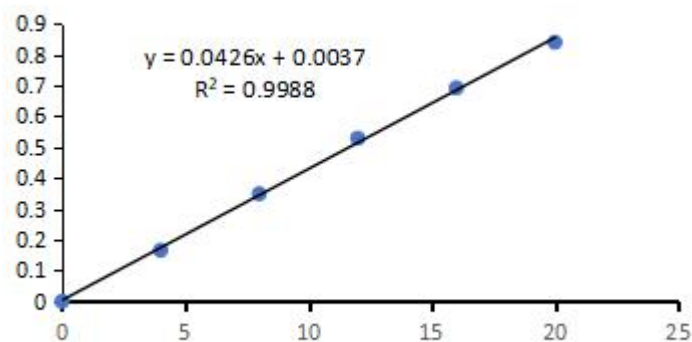
② 所有试剂解冻至室温 (25℃) 在 96 孔板中依次加入：

| 试剂组分 (μL)                                                                                | 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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定管需设一个对照管)。 |     |     |

- 【注】：1. 若  $\Delta A$  在零附近, 可增加样本加样体积  $V_1$  (即加样量增加至 40μL, 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:  $y = 0.0426x + 0.0037$ ;  $x$  为标准品摩尔质量 (nmol),  $y$  为  $\Delta A$ 。



### 2、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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0037) \div 0.0426 \div (V_1 \div V \times W) \div T \times D$$

$$= 78.25 \times (\Delta A - 0.0037) \div W \times D$$

### 3、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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0037) \div 0.0426 \div (V_1 \times C_{pr}) \div T \times D$$

$$= 78.25 \times (\Delta A - 0.0037) \div C_{pr} \times D$$

### 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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0037) \div 0.0426 \div V_1 \div T \times D$$

$$= 78.25 \times (\Delta A - 0.0037) \times D$$

### 5、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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = (\Delta A - 0.0037) \div 0.0426 \div (V_1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \times D$$

$$= 78.25 \times (\Delta A - 0.0037) \div \text{细胞数量} \times D$$

$V$ ---加入提取液体积, 1mL;

$V_1$ ---加入反应体系中样本体积, 10μL=0.01mL;

$W$ ---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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ mol/mL 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>$\mu$ mol/mL                                       | 0   | 0.4 | 0.8 | 1.2 | 1.6 | 2   |
| 标品稀释液<br>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 ( $\mu$ L)                                                    | 标准管 | 0 浓度管(仅做一次) |
|--------------------------------------------------------------------|-----|-------------|
| 标品                                                                 | 10  | 0           |
| 蒸馏水                                                                | 0   | 10          |
| 试剂二                                                                | 90  | 90          |
| 试剂三                                                                | 100 | 100         |
| 混匀, 5min 后立即于 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。 |     |             |