

## $\alpha$ -甘露糖苷酶( $\alpha$ -Mannosidase, $\alpha$ -Man)活性测定试剂盒

### 分光法 24 样

#### 产品简介:

$\alpha$ -甘露糖苷酶 (EC 3.2.1.24, $\alpha$ -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。 $\alpha$ -甘露糖苷酶 ( $\alpha$ -Man) 催化对硝基苯酚- $\alpha$ -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 $\alpha$ -甘露糖苷酶活性。

#### 试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水超声溶解备用。
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 20mL×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。

#### 所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、低温离心机、天平、研钵、冰和蒸馏水。

#### $\alpha$ -甘露糖苷酶 ( $\alpha$ -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 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。

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 可见分光光度计预热 30min，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：

试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	对照管
样本	30	30
试剂一	40	
试剂二	300	340
迅速混匀，37℃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,  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$  (每个测定管需设一个对照管)

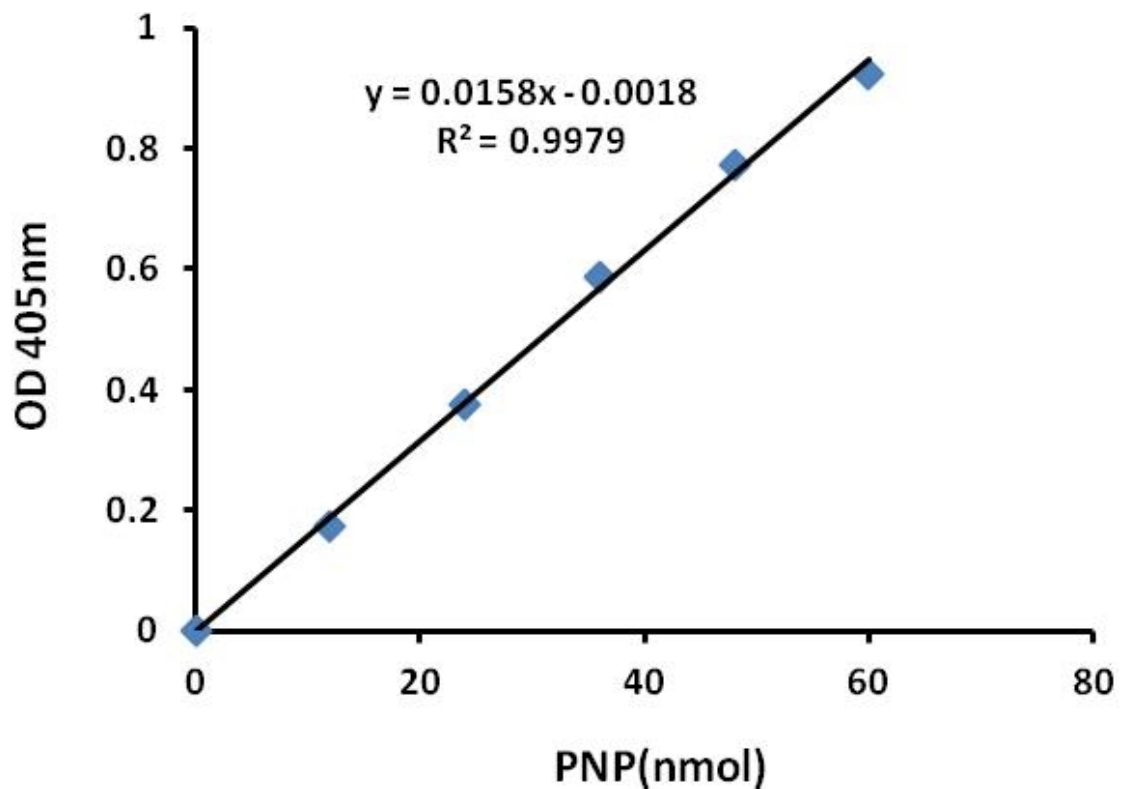
**[注]:** 1. 若  $\Delta A$  在零附近, 可增加样本加样体积 V1 (即加样量增加至 60 $\mu$ L, 则试剂二相应减少), 或延长保温时间 T (如: 由 30min 延长至 60min 或更长), 重新调整的 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

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。

结果计算:

### 1、标准曲线方程:

$y = 0.0158x - 0.0018$ ; x 为标准品摩尔质量 (nmol), y 为  $\Delta A$ 。



### 2、按照样本质量计算:

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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=(\Delta A+0.0018)\div 0.0158\div (V1\times Cpr)\div T\times D$$
$$=70.3\times(\Delta A+0.0018)\div Cpr\times D。$$

### 3、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：在 40°C下，每毫克蛋白每小时水解 1 $\mu$ molPNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶

活单位。 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶( $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{mg prot}$ )= $[(\Delta A+0.0022)\div 21.604]\div (Cpr\times V1)\div T\times D$

$$=3.47\times(\Delta A+0.0022)\div Cpr\times D。$$

### 4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10<sup>4</sup>个细胞每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚(PNP)为一酶活单位。 $\alpha$ -甘

露糖苷酶活性( $\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}$ )= $(\Delta A+0.0018)\div 0.0158\div (V1\div V\times\text{细胞数量})\div T\times D$

$$=70.3\times(\Delta A+0.0018)\div\text{细胞数量}\times D。$$

### 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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=(\Delta A+0.0018)\div 0.0158\div V1\div T\times D=70.3\times(\Delta A+0.0018)\times D$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入反应体系中样本体积，30 $\mu$ L=0.03mL；

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 $\mu$ mol/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 $\mu$ mol/mL。也可根据实际

样本来调整标准品浓度。

3. 在 EP 管中依次加入：30 $\mu$ L 标准品+340 $\mu$ L 试剂二+350 $\mu$ L 试剂三，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，根据结果制作标准曲线。