

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

微板法 48 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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	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℃保存	
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

### 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。

### $\alpha$ -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 酶标仪预热 30min，调节波长至 405nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	20	
试剂二	70	90
迅速混匀，37℃保温 20min		
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)。

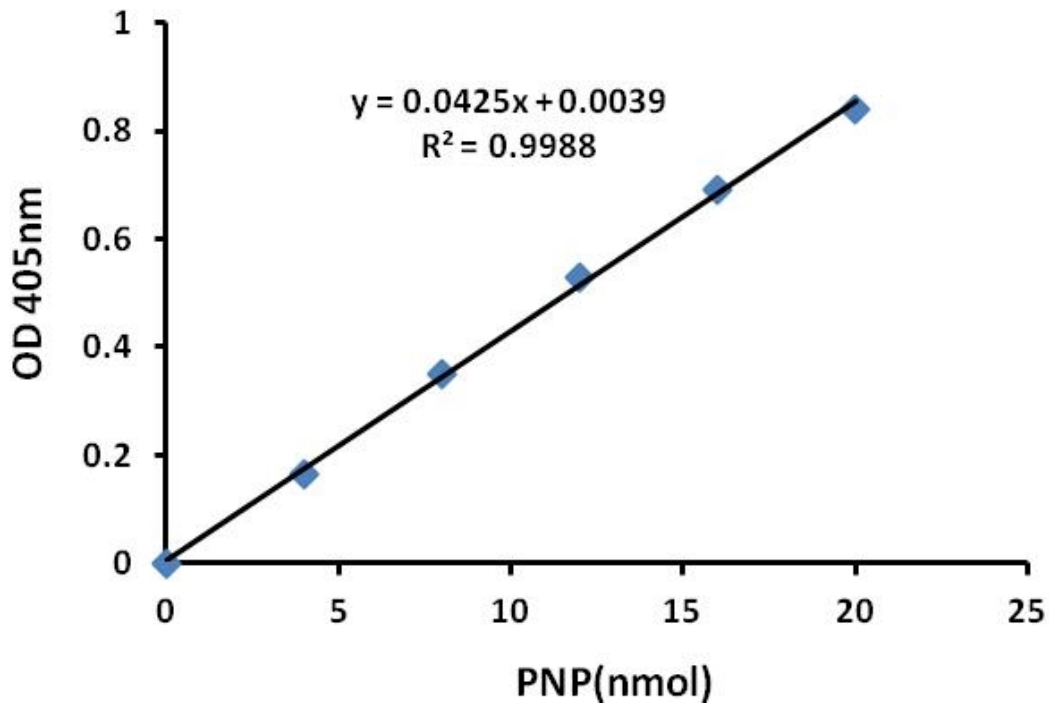
**【注】** 1. 若 $\Delta A$  在零附近, 可增加样本加样体积  $V_1$  (即加样量增加至  $40\mu\text{L}$ , 则试剂二相应减少), 或延长保温时间  $T$  (如: 由  $30\text{min}$  延长至  $60\text{min}$  或更长), 重新调整的  $V_1$  和  $T$  需代入计算公式重新计算。

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。

**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 $\Delta A$ 。



### 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。

$\alpha$ -甘露糖苷酶活性(nmol/min/mg prot) =  $(\Delta A - 0.0039) \div 0.0425 \div (V_1 \times C_{pr}) \div T \times D$

$$=78.43 \times (\Delta A - 0.0039) \div \text{Cpr} \times D$$

### 3、按照样本蛋白浓度计算：

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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0039) \div 0.0425 \div (V1 \div V \times W) \div T \times D$$

$$=78.43 \times (\Delta A - 0.0039) \div W \times D$$

### 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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = (\Delta A - 0.0039) \div 0.0425 \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \times D$$

$$=78.43 \times (\Delta A - 0.0039) \div \text{细胞数量} \times D$$

### 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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0039) \div 0.0425 \div V1 \div T \times D$$

$$=78.43 \times (\Delta A - 0.0039) \times D$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入反应体系中样本体积，10 $\mu$ L=0.01mL；

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 96 孔板中依次加入：10 $\mu$ L 标准品+90 $\mu$ L 试剂二+100 $\mu$ L 试剂三，混匀于 405nm

下读取吸光值，根据结果制作标准曲线。