

## $\alpha$ -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°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 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°C) 在 EP 管中依次加入:

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

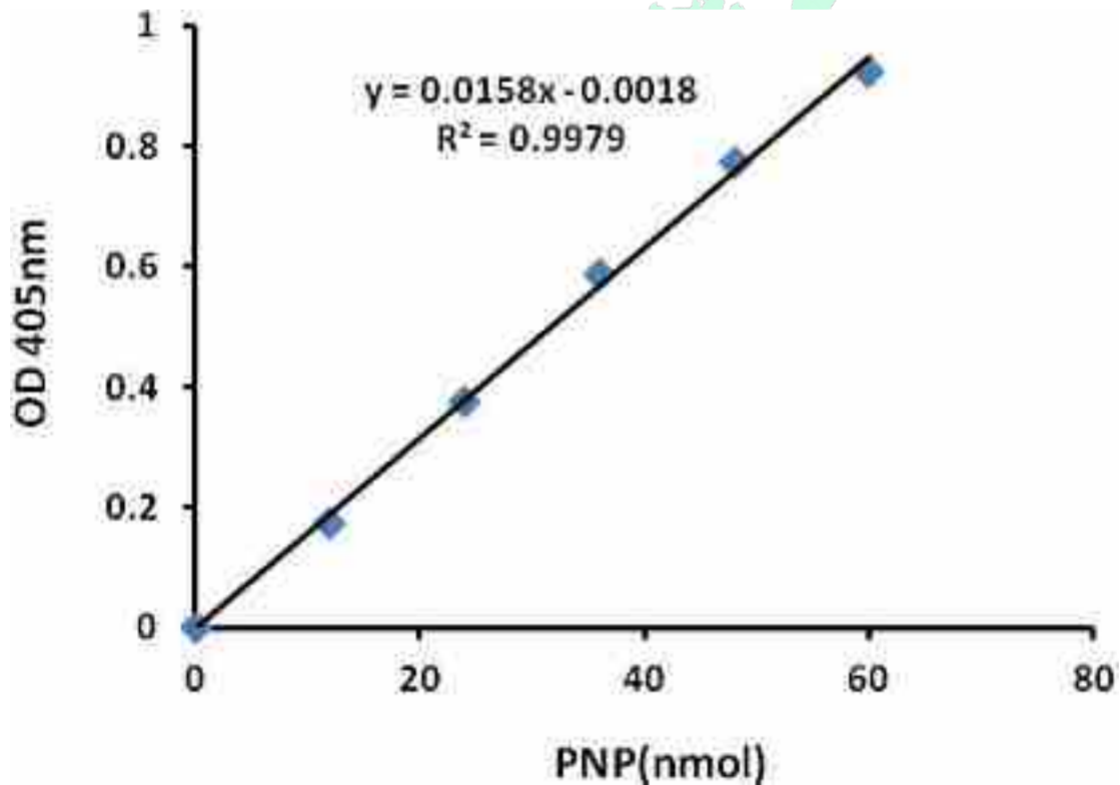
**[注]:** 1. 若 $\Delta A$  在零附近, 可增加样本加样体积 V1 (即加样量增加至 60 $\mu$ L, 则试剂二相应减少), 或延长保温时间 T (如: 由 30min 延长至 60min 或更长), 重新调整的 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

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)=( $\Delta A+0.0018$ ) $\div$ 0.0158 $\div$ (V1 $\times$ Cpr) $\div$ T $\times$ D

=70.3 $\times$ ( $\Delta A+0.0018$ ) $\div$  Cpr $\times$ D。

### 3、按样本质量计算:

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( $\mu$ mol/h/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(nmol/min/10<sup>4</sup>cell)=( $\Delta A+0.0018$ ) $\div$ 0.0158 $\div$ (V1 $\div$ V $\times$ 细胞数量) $\div$ T $\times$ D

=70.3 $\times$ ( $\Delta A+0.0018$ ) $\div$ 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。

$\alpha$ -甘露糖苷酶活性(nmol/min/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。

mlbio 酶联生物  
Good elisakit producers