

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

(货号: ADS-W-MAN001 微板法 48 样)

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 支	4°C保存	使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°C保存	
试剂三	液体 10mL×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。

三、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。

四、α-甘露糖苷酶 (α-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°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 酶标仪预热 30min，调节波长至 405nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (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， $\Delta A = A$ 测定 - A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

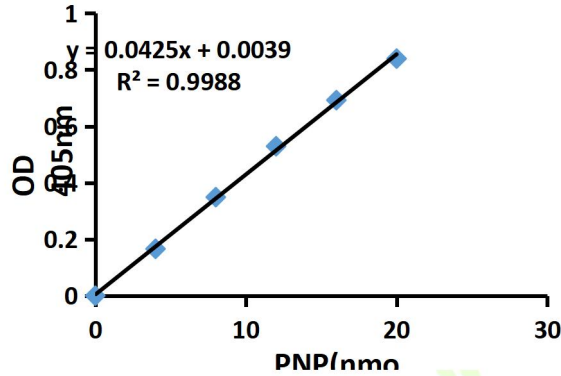
【注】：1. 若 ΔA 在零附近，可增加样本加样体积 V_1 (即加样量增加至 40μL，则试剂二相应减少)，或延长保

温时间 T (如: 由 30min 延长至 60min 或更长), 重新调整的 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: $y = 0.0425x + 0.0039$; 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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0039) \div 0.0425 \div (V1 \times Cpr) \div T \times D \\ &= 78.43 \times (\Delta A - 0.0039) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0039) \div 0.0425 \div (V1 \div V \times W) \div T \times D \\ &= 78.43 \times (\Delta A - 0.0039) \div W \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A - 0.0039) \div 0.0425 \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \times D \\ &= 78.43 \times (\Delta A - 0.0039) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0039) \div 0.0425 \div V1 \div T \times D \\ &= 78.43 \times (\Delta A - 0.0039) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, $10\mu\text{L}=0.01\text{mL}$;

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 ($10\mu\text{mol}/\text{mL}$): 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, $2\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。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: $10\mu\text{L}$ 标准品+ $90\mu\text{L}$ 试剂二+ $100\mu\text{L}$ 试剂三, 混匀于 405nm 下读取吸光值, 根据结果制作标准曲线。