

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

(货号: ADS-F-MAN001 分光法 24 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 30mL×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 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。

三、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。

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 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：

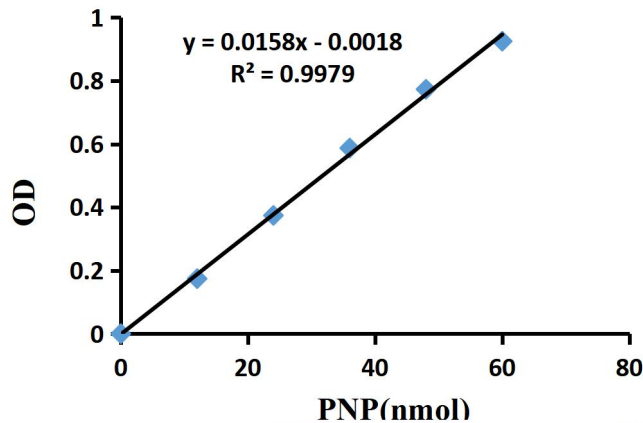
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	30	30
试剂一	40	
试剂二	300	340
迅速混匀，37°C保温 30min		
试剂三	350	350
混匀，5min 后吸取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色		

皿(光径 1cm) 中, 立即于 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (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 60 μL , 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: $y = 0.0158x - 0.0018$; 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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A + 0.0018) \div 0.0158 \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ = 70.3 \times (\Delta A + 0.0018) \div \text{Cpr} \times D$$

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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0018) \div 0.0158 \div (V_1 \div V \times W) \div T \times D \\ = 70.3 \times (\Delta A + 0.0018) \div W \times D$$

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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = (\Delta A + 0.0018) \div 0.0158 \div (V_1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \times D \\ = 70.3 \times (\Delta A + 0.0018) \div \text{细胞数量} \times D$$

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。

$$\alpha\text{-甘露糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A + 0.0018) \div 0.0158 \div V_1 \div T \times D = 70.3 \times (\Delta A + 0.0018) \times D$$

V ---加入提取液体积, 1mL; V_1 ---加入反应体系中样本体积, 30 μL =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 $\mu\text{mol}/\text{mL}$): 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 EP 管中依次加入: 30 μL 标准品+340 μL 试剂二+350 μL 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。