

α -Mannosidase Activity Kit

α -甘露糖苷酶 (α -Man) 活性测定试剂盒说明书

货号:BN72099| 方法: 可见分光法 | 规格: 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℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃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℃保存	
试剂三	液体 20mL×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。

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℃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:

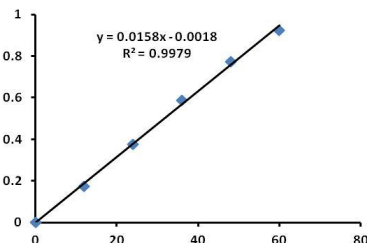
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	30	30
试剂一	40	
试剂二	300	340
迅速混匀, 37℃保温 30min		
试剂三	350	350

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

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调; 针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

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 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

- 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。

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

$$= 70.3 \times (\Delta A + 0.0018) \div \text{Cpr} \times D$$

- 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。

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

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

- 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。

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

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

- 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。

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

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, $30\mu\text{L} = 0.03\text{mL}$;

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;