

磷酸甘露糖异构酶 (Phosphomannose Isomerase) 活性测定说明书

(货号: BN72922 微板法 96 样)

一、产品简介:

磷酸甘露糖异构酶 (PMI, EC 5.3.1.8) 广泛存在于各种生物体内, 在糖代谢和细胞壁前体合成等途径中发挥着重要作用。

磷酸甘露糖异构酶 (PMI) 催化 6-磷酸甘露糖生成 6-磷酸果糖, 接着在专一异构酶和磷酸葡萄糖脱氢酶的依次作用下, 使 NADP^+ 还原成 NADPH , 通过检测在 340nm 处的上升量来计算 PMI 酶活性大小。

二、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 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下或离心, 使粉剂落入底部, 再加 2.3mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下或离心, 使粉剂落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用, 可分装后 -20℃ 保存, 避免反复冻融。
试剂三	液体 μL ×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下或离心, 使微量液体落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水混匀备用, 可分装后 -20℃ 保存, 避免反复冻融。
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下或离心, 使粉体落入底部, 再加 2.3mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

四、磷酸甘露糖异构酶 (PMI) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 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 的比例提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 超声波破碎细胞 (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/细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 设置温度 30℃, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温或于 30℃ 条件下水浴 5min;

③ 试剂二和三和四可按照 10:10:120 比例配成混合液 (一枪加 140 μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 在 96 孔板中依次加入:

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	20
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	120
混匀, 室温 (25°C) 孵育 15min 于 340nm 处读取 A1 值。	
试剂五	20
混匀, 室温 (25°C) 孵育反应 10min 于 340nm 处读取 A2 值, ΔA=A2-A1。	

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PMI}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PMI}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算:

单位定义: 每 1 万个细胞每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PMI}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

ε---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

V2---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

T---反应时间, 10 min;

W---样本质量, g;

500---细胞数量, 万;

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。