

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

(货号: BN72923 分光法 48 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60mL×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2.4mL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蒸馏水溶解备用, 可分装后-20℃保存, 避免反复冻融。
试剂四	液体35mL×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2.4mL蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、水浴锅、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 (10⁴): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

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 20:20:550 比例配成混合液 (一枪加 590μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 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	50
试剂一	40
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	550
混匀，室温（25℃）孵育15min于340nm处读取A1值。	
试剂五	40
混匀，室温（25℃）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。

$$PGI(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 231.5 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$PGI(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 231.5 \times \Delta A \div W$$

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。

$$PGI(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.463 \times \Delta A$$

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

d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.05mL；

V2---反应体系总体积， $7.2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

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。