

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

（货号：G0897F48 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：

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, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】:** 1. 若 ΔA 小于 0.01, 可以延长最后一步的反应时间 T (如: 20min 或更长) 再读取 A2, 或增加样本加样量 V1 (如增至 100μL, 则试剂四相应减小), 或增加取样质量 W。则改变后的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高, 或其他因素), 可适当减少样本加样量 V (如减至 20μL, 则试剂四相应增加), 则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。

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。