

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

（货号：G0897W48 微板法 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1.2mL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0.65mL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0.6mL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10mL×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1.2mL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 140μL 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：

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℃）孵育15min于340nm处读取A1值。	
试剂五	20
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 40μL，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 10μL，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。

$$PMI(nmol/min/mg \text{ prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 321.5 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$PMI(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

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。

$$PMI(nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

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。