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°C保存	
试剂一	粉剂mg×1支	4°C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°C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°C保存，避免反复冻融。
试剂三	液体μL×1支	-20°C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°C保存，避免反复冻融。
试剂四	液体35mL×1瓶	4°C保存	
试剂五	粉剂mg×1支	4°C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°C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°C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 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°C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，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(nmol/min/mg prot)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(V1×Cpr)÷T=231.5×ΔA÷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(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=231.5×ΔA÷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(nmol/min/10^4 cell)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=0.463×ΔA

ε---NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 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，7.2×10^{-4} 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。