

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

（货号：G0897W96 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(10⁶)：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°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。

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

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。

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

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。

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

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

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。