

α -L-鼠李糖苷酶(α -L-rhamnosidase)活性测定试剂盒说明书

(货号:BP10291F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、产品简介:

α -L-鼠李糖苷酶 (α -L-rhamnosidase, EC 3.2.1.40) 是一种水解酶, 可以水解人们日常饮食中常见的黄酮苷类化合物。该酶广泛分布于自然界的细菌和真菌等生物中。它在工业上具有许多潜在的应用价值。

本试剂盒采用对硝基酚- α -鼠李糖苷(PNPR)作为底物, 生成黄色的对硝基苯酚 (PNP), 该产物在 405nm 处有最大吸收峰。通过检测 PNP 在 405nm 下的增加速率, 即可得到 α -L-鼠李糖苷酶活性的大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2.2mL 蒸馏水溶解混匀, 若难溶解可超声溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、所需的仪器和用品:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 组织样本: 取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 4℃×12000rpm 离心 15min, 取上清液待测。

【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; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 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。

- ③ 液体样本: 可直接测定, 或者适当稀释后测定。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

- ① 分光光度计预热 30 min, 调节波长为 405nm, 蒸馏水调零。
- ② 所有试剂于 40℃水浴中预热 20 min。

③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入下列试剂：

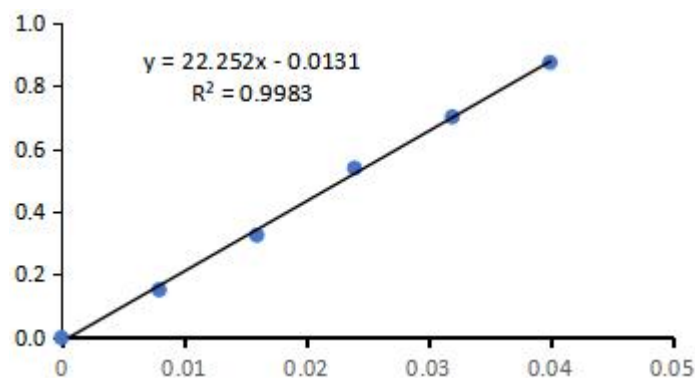
试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	80	
试剂二	280	360
迅速混匀，40℃保温 20min		
试剂三	400	400
混匀，液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管需设一个对照管）。		

【注】：①若 ΔA 的值非常低在零附近，可增加样本量 V1（如增至 80μL，则试剂二相应减少）或延长反应时间 T（如增至 30min 或更长），则重新调整的 V1 和 T 须代入公式重新计算。

②若 ΔA 的值超过 1，则需要稀释样本，稀释倍数 D 代入计算公式；

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 22.252x - 0.0131$ ，x 是标准品（PNP）摩尔质量：μmol；y 是 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

酶活定义：在 40℃ 下，每克组织每小时水解 1μmolPNPR 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0131) \div 22.252] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 3.37 \times (\Delta A + 0.0131) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：在 40℃ 下，每毫克蛋白每小时水解 1μmolPNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0131) \div 22.252] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

$$= 3.37 \times (\Delta A + 0.0131) \div Cpr \times D$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：在 40℃ 下，每 10⁴ 个细胞每小时水解 1μmolPNPP 产生 PNP 定义为 1 酶活单位。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0131) \div 22.252] \div (500 \times V1) \div T \times D$$

$$= 0.007 \times (\Delta A + 0.0131) \times D$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：在 40℃ 下，每毫升液体每小时水解 1μmolPNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0131) \div 22.252] \div V1 \div T \times D = 3.37 \times (\Delta A + 0.0131)$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积（mL），0.04mL；

T---反应时间, 20 min=1/3h; D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr---上清液蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水溶解, 若有结晶析出, 需 37°C 水浴至完全溶解, 标准品母液浓度为 10 μ mol/ml。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 μ mol/ml。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 100uL, 加入 900uL 蒸馏水, 混匀得到 1 μ mol/ml 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		40
试剂二	360	360
试剂三	400	400
混匀, 于 405nm 处读取吸光值 A, $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		