

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

(货号:BP10291W 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 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 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 10mL×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、实验器材:

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)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- 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、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30 min, 调节波长为 405nm。

② 所有试剂于 40℃ 水浴中预热 20 min。

③ 在 96 孔板中依次加入下列试剂：

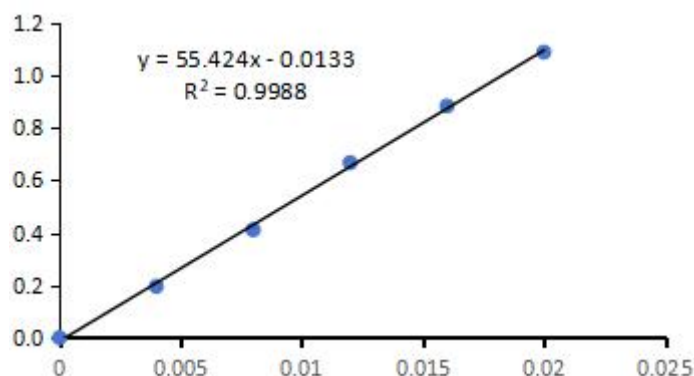
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	20	
试剂二	70	90
迅速混匀，40℃ 保温 20min		
试剂三	100	100
混匀，5min 后立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管需设一个对照管）。		

【注】：①若 ΔA 的值非常低在零附近，可增加样本量 V1（如增至 20μL，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 = 55.424x - 0.0133，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。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0133) \div 55.424] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 5.41 \times (\Delta A + 0.0133) \div W \times D$$

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。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0133) \div 55.424] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

$$= 5.41 \times (\Delta A + 0.0133) \div Cpr \times D$$

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。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0133) \div 55.424] \div (500 \times V1) \div T \times D$$

$$= 0.011 \times (\Delta A + 0.0133) \times D$$

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。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0133) \div 55.424] \div V1 \div T \times D = 5.41 \times (\Delta A + 0.0133)$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积（mL），0.01mL；

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℃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, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 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 200 μ L，加入 800 μ L 蒸馏水，混匀得到 2 μ mol/ml 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/ml	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
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	10	
蒸馏水		10
试剂二	90	90
试剂三	100	100
混匀，于 405nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		