

α -木糖苷酶 (α -xylosidase) 活性测定试剂盒说明书

(分光法 24 样)

一、产品简介：

α -木糖苷酶(EC 3.2.1.177)是一类木聚糖降解水解酶，存在于植物、细菌和真菌等生物体，促使非还原末端 α -D-木糖残基的水解，释放出 α -D-木糖。

α -木糖苷酶催化对硝基苯酚- α -D-木糖苷产生对硝基苯酚 (PNP)，该产物在 405nm 处有特征吸收峰，通过测定 405nm 光吸收增加速率，即可计算 α -木糖苷酶活性。

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 mg×1 支	4℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液 27mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、低温离心机、天平、研钵、冰和蒸馏水。

四、 α -木糖苷酶活性测定：

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

1、样本的制备：

① 组织样本：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），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 比例提取。

② 细菌或细胞：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 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，可按照细菌或细胞数量(10^4 个)：提取液体积(mL)为 500~1000：1 的比例提取。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

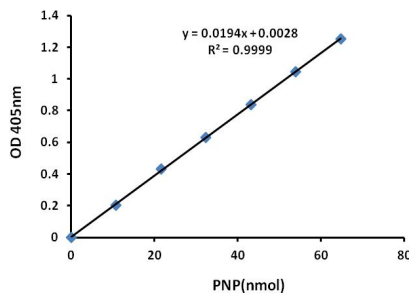
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	30	30
试剂一	75	
蒸馏水		75
试剂二	135	135
迅速混匀，40℃保温 20min		
试剂三	540	540
混匀，取全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定		

管需设一个对照管)。

【注】: 若 ΔA 低于 0.01, 可增加样本取样量 V_1 (如增至 $60\mu\text{L}$, 则试剂三相应减少), 或延长保温时间 (如: 40min 或更长), 或增加样本质量 W , 则改变后的 V_1 和 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y=0.0194x+0.0028$; x 为标准品摩尔质量 (nmol), y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算:

定义: 40°C 下, 每毫克蛋白每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚 (PNP) 为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0028) \div 0.0194 \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 85.9 \times (\Delta A - 0.0028) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本质量计算:

定义: 40°C 下, 每克组织每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚 (PNP) 为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0028) \div 0.0401 \div (V_1 \div V \times W) \div T \\ &= 85.9 \times (\Delta A - 0.0028) \div W \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

定义: 40°C 下, 每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚 (PNP) 为一酶活单位。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A - 0.0028) \div 0.0401 \div (V_1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \\ &= 85.9 \times (\Delta A - 0.0028) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

5、按液体体积计算:

定义: 40°C 下, 每毫升液体每分钟催化产生 1 nmol 对硝基苯酚 (PNP) 为一个酶活单位。

$$\alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0028) \div 0.0401 \div V_1 \div T = 85.9 \times (\Delta A - 0.0028)$$

V ---加入提取液体积, 1mL ; V_1 ---加入反应体系中样本体积, $30\mu\text{L}=0.03\text{mL}$;

W ---样本质量, g ; 500 ---细胞或细菌总数, 500 万;

T ---反应时间, 20min ; PNP 对分子质量--- 139.11 ;

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。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 ($1\text{mg}/\text{mL}$): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: $0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 \text{ mg}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入: $30\mu\text{L}$ 标准品+ $75\mu\text{L}$ 蒸馏水+ $135\mu\text{L}$ 试剂二+ $540\mu\text{L}$ 试剂三, 混匀, 取全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿中, 于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。