

# $\alpha$ -木糖苷酶 ( $\alpha$ -xylosidase) 活性测定试剂盒说明书

(微板法 48 样)

## 一、产品简介：

$\alpha$ -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 $\alpha$ -D-木糖残基的水解，释放出 $\alpha$ -D-木糖。

$\alpha$ -木糖苷酶催化对硝基苯酚- $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 1.4mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液 20 mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂

## 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温离心机、天平、研钵、冰和蒸馏水。

## 四、 $\alpha$ -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°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 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°C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 酶标仪预热 30min，调节波长至 405nm。

② 在 EP 管中依次加入：

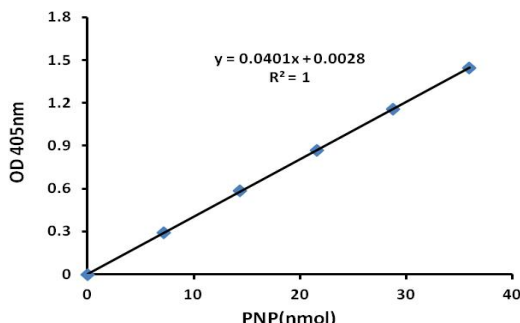
试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	25	
蒸馏水		25
试剂二	45	45
迅速混匀，40°C保温 20min		
试剂三	180	180
混匀，取 200 $\mu$ L 转移到 96 孔板中，405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

【注】：若 $\Delta A$  低于 0.01，可增加样本取样量 V1 (如增至 30 $\mu$ 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 V1 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： $y = 0.0401x + 0.0028$ ；x 为标准品摩尔质量（nmol），y 为  $\Delta A$ 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：40℃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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0028) \div 0.0401 \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 124.7 \times (\Delta A - 0.0028) \div Cpr \end{aligned}$$

3、按样本质量计算：

定义：40℃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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0028) \div 0.0401 \div (V1 \div V \times W) \div T \\ &= 124.7 \times (\Delta A - 0.0028) \div W \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

定义：40℃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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A - 0.0028) \div 0.0401 \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \\ &= 124.7 \times (\Delta A - 0.0028) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

定义：40℃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。

$$\alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0028) \div 0.0401 \div V1 \div T = 124.7 \times (\Delta A - 0.0028)$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中样本体积，10 $\mu$ L=0.01mL；

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（1mg/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, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入：10 $\mu$ L 标准品+25 $\mu$ L 蒸馏水+45 $\mu$ L 试剂二+180 $\mu$ L 试剂三，混匀，取 200 $\mu$ L 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。