

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

(微板法 48 样)

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 50mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解混匀, 若难溶解可超声溶解。
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 mg×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:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、恒温培养箱、研钵、蒸馏水。

四、 α -L-鼠李糖苷酶活性测定:

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 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:

试剂名称 (μ L)	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		

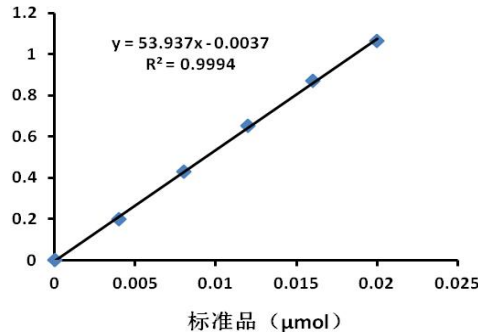
试剂三	100	100
混匀,5min 后立即于 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A=A$ 测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

【注】: ①若 ΔA 的值非常低在零附近, 可增加样本量 V1 (如增至 20 μ L, 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: $y = 53.937x - 0.0037$, x 是标准品 (PNP) 摩尔质量: μ mol; y 是 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

酶活定义: 在 40 $^{\circ}$ C 下, 每克组织每小时水解 1 μ molPNPR 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0037) \div 53.937] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 5.56 \times (\Delta A + 0.0037) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 在 40 $^{\circ}$ C 下, 每毫克蛋白每小时水解 1 μ molPNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0037) \div 53.937] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

$$= 5.56 \times (\Delta A + 0.0037) \div Cpr \times D$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 在 40 $^{\circ}$ C 下, 每 10⁴ 个细胞每小时水解 1 μ molPNPP 产生 PNP 定义为 1 酶活单位。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0037) \div 53.937] \div (500 \times V1) \div T \times D$$

$$= 0.011 \times (\Delta A + 0.0037) \times D$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 在 40 $^{\circ}$ C 下, 每毫升液体每小时水解 1 μ molPNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0037) \div 53.937] \div V1 \div T \times D = 5.56 \times (\Delta A + 0.0037)$$

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 制备标准品母液 (10 μ mol/ml): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水溶解, 若有结晶析出, 需 37 $^{\circ}$ C 水浴至完全溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 μ mol/ml。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 10 μ l 的标准品+90 μ l 的试剂二, 再加 100 μ l 的试剂三, 于 405nm 处读值; 根据结果即可制作标准曲线。