

α -L-鼠李糖苷酶(α -L-rhamnosidase)测定试剂盒

微板法 48 样

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。

试剂盒组成和配制:

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。

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。

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°C×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°C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°C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 (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°C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）。

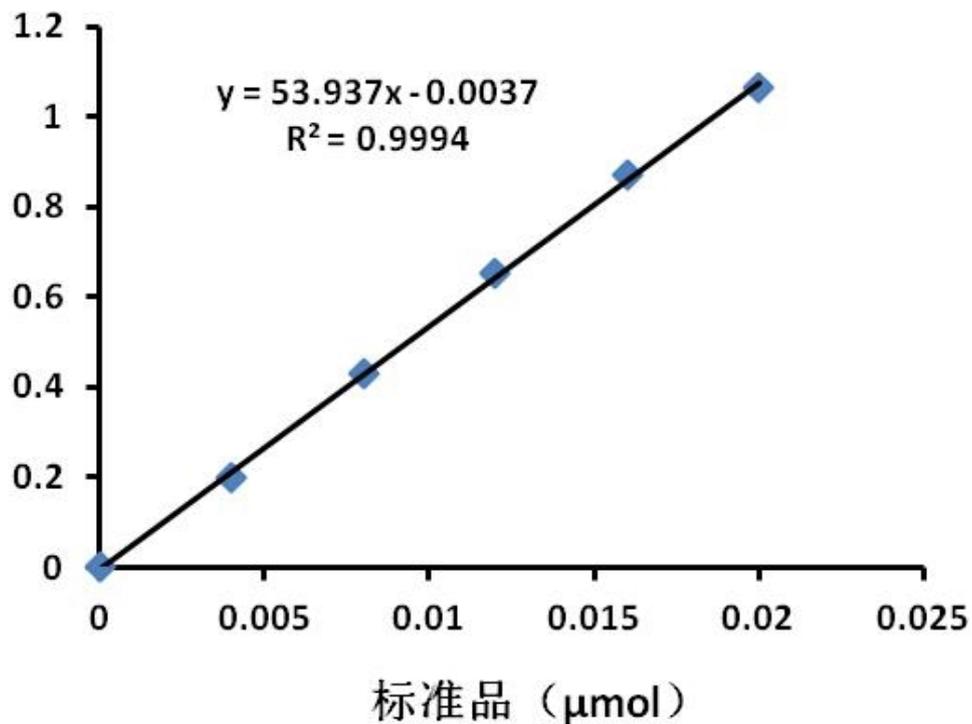
【注】 ①若 ΔA 的值非常低在零附近，可增加样本量 V1（如增至 20 μ L，则试剂二相应减少）或延长反应时间 T（如增至 30min 或更长），则重新调整的 V1 和 T 须代入公式重新计算。

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；

结果计算：

1、标准曲线方程：

$y = 53.937x - 0.0037$ ，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°C下，每毫克蛋白每小时水解 1 μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

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

4、按细胞数量计算：

酶活定义：在 40°C下，每 10⁴个细胞每小时水解 1 μmol PNPP 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°C下，每毫升液体每小时水解 1 μmol PNPP 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°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 10ul 的标准品+90ul 的试剂二, 再加 100ul 的试剂三, 于 405nm 处读值; 根据结果即可制作标准曲线。