

**$\alpha$ -L-鼠李糖苷酶( $\alpha$ -L-rhamnosidase)活性测定试剂盒说明书**

(分光法 24 样)

**一、产品简介:**

$\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 ( $\alpha$ -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- $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 30mL×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 2.2mL 蒸馏水溶解混匀, 若难溶解可超声溶解。
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 20mL×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:**

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、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、 $\alpha$ -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 可见分光光度计预热 30 min, 调节波长为 405nm, 蒸馏水调零。  
 ② 所有试剂于 40℃ 水浴中预热 20 min。  
 ③ 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入下列试剂:

试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	80	
试剂二	280	360

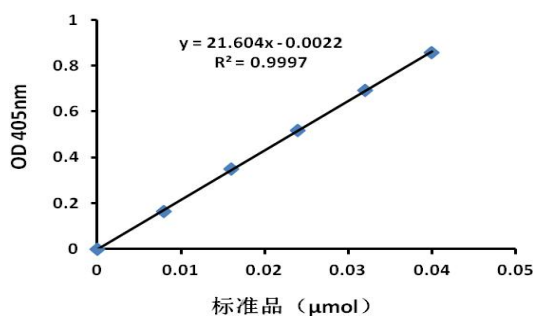
迅速混匀，40℃保温 20min		
试剂三	400	400
混匀，液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。		

【注】：①若 $\Delta A$  的值非常低在零附近，可增加样本量 V1（如增至 80 $\mu$ 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 $\Delta A$  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： $y = 21.604x - 0.0022$ ，x 是标准品（PNP）摩尔质量： $\mu$ mol；y 是 $\Delta A$ 。



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 1 $\mu$ molPNPR 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta A+0.0022)\div 21.604]\div(W\times V1\div V)\div T\times D$$

$$=3.47\times(\Delta A+0.0022)\div W\times D$$

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 1 $\mu$ molPNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h/mg prot})=[(\Delta A+0.0022)\div 21.604]\div(Cpr\times V1)\div T\times D$$

$$=3.47\times(\Delta A+0.0022)\div Cpr\times D$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：在 40℃下，每 10<sup>4</sup> 个细胞每小时水解 1 $\mu$ molPNPP 产生 PNP 定义为 1 酶活单位。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0022)\div 21.604]\div(500\times V1)\div T\times D$$

$$=0.007\times(\Delta A+0.0022)\times D$$

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 1 $\mu$ molPNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}(\mu\text{mol/h/mL})=[(\Delta A+0.0022)\div 21.604]\div V1\div T\times D =3.47\times(\Delta A+0.0022)$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积（mL），0.04mL；

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 $\mu$ 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℃ 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, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 $\mu$ mol/ml。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 40ul 的标准品+360ul 的试剂二，再加 400ul 的试剂三，于 405nm 处读值；根据结果即可制作标准曲线。