α-L-鼠李糖苷酶(α-L-rhamnosidase)活性测定试剂盒说明书

（货号:G0580F 分光法 24 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 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、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 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（μL）	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	80	
试剂二	280	360

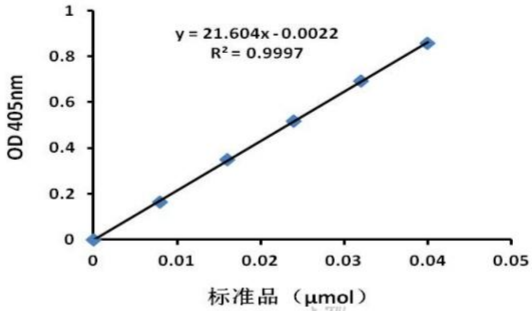
迅速混匀，40℃保温 20min		
试剂三	400	400
混匀，液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 405nm 下读取吸光值 A，ΔA=A 测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。		

【注】：①若△A 的值非常低在零附近，可增加样本量 V1（如增至 80μL，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△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：μmol；y 是△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 1μmoLPNPR 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

α-L-鼠李糖苷酶(μmol/h/g 鲜重)=[(△A+0.0022)÷21.604]÷(W×V1÷V)÷T×D

=3.47×(△A +0.0022)÷W×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 1μmoLPNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

α-L-鼠李糖苷酶(μmol/h/mg prot)=[(△A+0.0022)÷21.604]÷(Cpr×V1)÷T×D

=3.47×(△A +0.0022)÷Cpr×D

4、按细胞数量计算：

酶活定义：在 40℃下，每 10^4 个细胞每小时水解 1μmoLPNPP 产生 PNP 定义为 1 酶活单位。

α-L-鼠李糖苷酶(μmol/h/10^4 cell)=[(△A+0.0022)÷21.604]÷(500×V1)÷T×D

=0.007×(△A +0.0022)×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 1μmoLPNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

α-L-鼠李糖苷酶(μmol/h/mL)= [(△A+0.0022)÷21.604]÷V1÷T×D =3.47×(△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（10μmol /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, 1μmol/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。