

## α-木糖苷酶 (α-xylosidase) 活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TDX022 分光法 24 样)

### 一、产品简介：

α-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α-D-木糖残基的水解，释放出α-D-木糖。

α-木糖苷酶催化对硝基苯酚-α-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α-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 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 支	4°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 27mL×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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、低温离心机、天平、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、α-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 可见分光光度计预热 30min，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

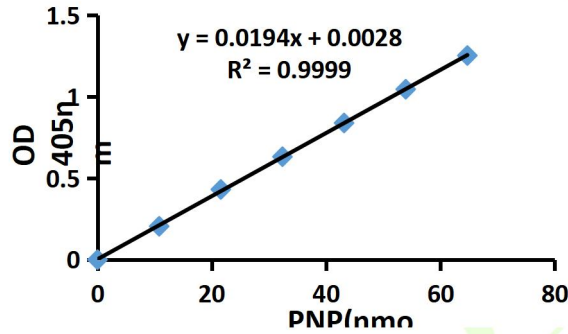
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	30	30
试剂一	75	
蒸馏水		75
试剂二	135	135
迅速混匀，40°C保温 20min		
试剂三	540	540
混匀，取全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定		

管需设一个对照管)。

【注】：若 $\Delta A$  低于 0.01，可增加样本取样量  $V_1$ （如增至 60 $\mu\text{L}$ ，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  $V_1$  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： $y=0.0194x+0.0028$ ； $x$  为标准品摩尔质量（nmol）， $y$  为 $\Delta A$ 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：40°C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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0028) \div 0.0194 \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 85.9 \times (\Delta A - 0.0028) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本质量计算：

定义：40°C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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0028) \div 0.0401 \div (V_1 \div V \times W) \div T \\ &= 85.9 \times (\Delta A - 0.0028) \div W \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

定义：40°C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。

$$\begin{aligned} \alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A - 0.0028) \div 0.0401 \div (V_1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T \\ &= 85.9 \times (\Delta A - 0.0028) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

定义：40°C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。

$$\alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0028) \div 0.0401 \div V_1 \div T = 85.9 \times (\Delta A - 0.0028)$$

$V$ ---加入提取液体积，1mL；

$V_1$ ---加入反应体系中样本体积，30 $\mu\text{L}$ =0.03mL；

$W$ ---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；

$\text{Cpr}$ ---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, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入：30 $\mu\text{L}$  标准品+75 $\mu\text{L}$  蒸馏水+135 $\mu\text{L}$  试剂二+540 $\mu\text{L}$  试剂三，混匀，取全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。