

α-木糖苷酶 (α-xylosidase) 活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX022 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.4mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

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℃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 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 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℃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(10⁴个): 提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例提取。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 405nm。

② 在 EP 管中依次加入：

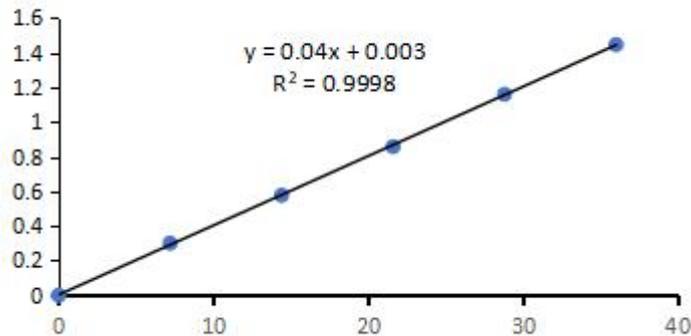
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	25	

蒸馏水		25
试剂二	45	45
迅速混匀, 40°C保温 20min		
试剂三	180	180
混匀, 取 200μL 转移到 96 孔板中, 405nm 处测定吸光值 A, ΔA=A 测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

【注】：若ΔA 低于 0.01, 可增加样本取样量 V1 (如增至 30μL, 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 V1 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： $y = 0.04x + 0.003$; x 为标准品摩尔质量 (nmol), y 为ΔA。



2、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。

$$\alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.003) \div 0.04 \div (V1 \div V \times W) \div T$$

$$= 125 \times (\Delta A - 0.003) \div W$$

3、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。

$$\alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.003) \div 0.04 \div (V1 \times Cpr) \div T$$

$$= 125 \times (\Delta A - 0.003) \div Cpr$$

4、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。

$$\alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.003) \div 0.04 \div V1 \div T = 125 \times (\Delta A - 0.003)$$

5、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。

$$\alpha\text{-木糖苷酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = (\Delta A - 0.003) \div 0.04 \div (V1 \div V \times 500) \div T$$

$$= 0.25 \times (\Delta A - 0.003)$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, $10\mu\text{L} = 0.01\text{mL}$;

W---样本质量, g;

500---细胞或细菌总数, 万;

T---反应时间, 20min;

PNP 对分子质量---139.11。

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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL，加入 500μL 蒸馏水，混匀得到 0.5 mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	20	40	60	80	100
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
蒸馏水	25	35
试剂二	45	45
试剂三	180	180
混匀，取 200μL 转移到 96 孔板中，405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		