

α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Arabinofuranosidase, α -L-Af)

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

α -L-Af 是一种能够水解非还原呋喃阿拉伯糖残基的糖苷酶类，使细胞壁阿拉伯半乳聚糖、阿拉伯甘露聚糖等中性糖不断解离，促进果胶的增溶和降解。由于果实成熟过程中常常伴随着阿拉伯糖的丧失，该酶活性在果实成熟软化中的研究具有重大意义。

测定原理：

α -L-Af 分解对硝基酚阿拉伯呋喃糖苷生成对-硝基苯酚，后者在 400nm 有最大吸收峰，通过测定吸光值升高速率来计算 α -L-Af 活性。

组成：

产品名称	GMS042-50T/24S	Storage
提取液：液体	50ml	4°C
试剂一：粉剂	1 瓶	-20°C
试剂二：液体	15ml	4°C
试剂三：液体	50ml	4°C
说明书	一份	

试剂一：粉剂×1 瓶，-20°C 保存；临用前每瓶加入 5ml 蒸馏水，充分溶解备用；用不完的试剂仍-20°C 保存。

自备仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取：

1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；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（建议 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）；15000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。



2、组织：按照组织质量（g）：提取液体积(ml)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1ml 提取液），进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μl)	测定管	对照管
试剂一	200	
蒸馏水		200
试剂二	250	250
样本	50	50

迅速混匀，放入 37℃准确水浴 30min

试剂三	1000	1000
-----	------	------

充分混匀，400nm 处测定吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

α-L-Af 活性计算：

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.00585x - 0.0027$ ；x 为标准品浓度（nmol/ml），y 为吸光值。

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每 min 产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-L-Af 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-L-Af 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-L-Af 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.08 \times (\Delta A + 0.0027)$$

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/ml; V 反总: 反应体系总体积, 0.5ml; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.05ml; V 样总: 加入提取液体积, 1ml; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; T: 反应时间, 30min。

