

α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Arabinofuranosidase, α -L-Af) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 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	GMS043-100T/48S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂二: 液体	4ml	4°C
试剂三: 液体	13ml	4°C
说明书	一份	

试剂一: 粉剂 \times 1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 2.5ml 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:

酶标仪/可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔板/微量石英比色皿、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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定（在 EP 管或 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μl)	测定管	对照管
试剂一	25	
蒸馏水		25
试剂二	35	35
样本	10	10

迅速混匀，放入 37℃保温 30min

试剂三	130	130
-----	-----	-----

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：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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

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

(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, 0.07ml; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.01ml;

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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0039x - 0.0027$ ；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。

$$\alpha\text{-L-Af 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{Cpr}$$

(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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



$$\alpha\text{-L-Af 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[(\Delta A+0.0027)\div 0.0039\times V_{\text{反总}}]\div(W\times V_{\text{样}}\div V_{\text{样总}})\div T$$
$$=59.83\times(\Delta A+0.0027)\div W$$

(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。

$$\alpha\text{-L-Af 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell})=[(\Delta A+0.0027)\div 0.0039\times V_{\text{反总}}]\div(500\times V_{\text{样}}\div V_{\text{样总}})\div T$$
$$=0.12\times(\Delta A+0.0027)$$

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/ml; V 反总: 反应体系总体积, 0.07ml; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.01ml;

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。

