

α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶(α-L-Arabinofuranosidase, α-Afa)试剂盒说明书 (分光法 24 样)

一、产品简介:

α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α-Afa, EC 3.2.1.55) 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。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法, α-Afa分解对-硝基苯阿拉伯呋喃糖苷生成对-硝基苯酚, 后者在405nm有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率即可得出α-Afa酶活性大小。

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°C保存 | |
| 试剂一 | 粉体 mg×1 支 | -20°C保存 | 临用前甩几下使所有粉体都落入管底, 加 2mL 蒸馏水溶解。 |
| 试剂二 | 液体 27mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 标准品 | 粉体 mg×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)、低温台式离心机、水浴锅、研钵

四、α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α-Afa) 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: 称取约 0.2g 组织 (水分充足的样本取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 然后 12000rpm, 4°C, 离心 10min, 取上清作为粗体液, 置于冰上待测。

【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 的比例进行提取

② 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 以上, 温度设定 37°C, 波长设定为 405nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

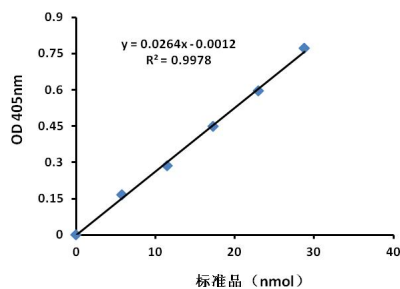
③ 在 EP 管中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|---|-----|-----|
| 样本 | 40 | 40 |
| 试剂一 | 75 | |
| 蒸馏水 | | 75 |
| 提取液 | 115 | 115 |
| 迅速混匀, 37°C保温 30min | | |
| 试剂二 | 540 | 540 |
| 混匀, 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中, 于 405nm 处测定吸光 A, ΔA=A 测定-A 对照 (每个样本需设一个对照管)。 | | |

【注】: 若ΔA 过小, 可以延长保温时间 (如: 40min 或更长), 或增加样本加样量 V1(如增至 80μL, 则提取液相应减少), 则改变后的反应时间 T 和加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 0.0264x - 0.0012$ ；x 为标准品摩尔质量 (nmol)，y 为 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-Afa 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0012) \div 0.0264] \div (V1 \times Cpr) \div T$$

$$= 31.57 \times (\Delta A + 0.0012) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

单位的定义：每克组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-Afa 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0012) \div 0.0264] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 31.57 \times (\Delta A + 0.0012) \div W$$

V----加入提取液体积，1mL；

V1----加入反应体系中样本体积，0.04mL；

W----样本质量，g；

T----反应时间，30min；

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 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, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入：40 μ L 标准品+75 μ L 蒸馏水+115 μ L 提取液+540 μ L 试剂二，混匀，全部液体转移至 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。