

α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶(α-L-Arabinofuranosidase, α-Afa)试剂盒说明书 (微板法 48 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使试剂粉体落入底部, 再加 1.5mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	液体 18mL×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

酶标仪、96孔板、低温台式离心机、水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

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 酶标仪预热 30min 以上, 温度设定 37°C, 波长设定为 405nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

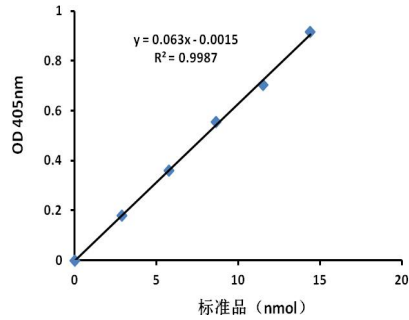
③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	25	
蒸馏水		25
提取液	35	35
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂二	180	180
混匀, 取 200μL 至 96 孔板中, 于 405nm 处测定吸光值 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 20μL, 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 $y = 0.063x - 0.0015$ ；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。

$$\alpha\text{-Afa 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0015) \div 0.063] \div (V1 \times Cpr) \div T$$

$$= 52.9 \times (\Delta A + 0.0015) \div Cpr$$

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。

$$\alpha\text{-Afa 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0015) \div 0.063] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 52.9 \times (\Delta A + 0.0015) \div W$$

V----加入提取液体积，1mL；

V1----加入反应体系中样本体积，0.01mL；

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, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入：10 μ L 标准品+25 μ L 蒸馏水+35 μ L 提取液+180 μ L 试剂二，混匀，取 200 μ L 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。