

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

(货号: BP10429F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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。

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉体 1 支	-20°C 避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2mL 蒸馏水溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 27mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉体 1 支	4°C 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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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、样本提取:

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: 可直接测定, 或者适当稀释后测定。若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 细菌/细胞样本: 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 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

① 分光光度计预热 30min 以上 (等仪器过自检程序亦可), 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℃) 。

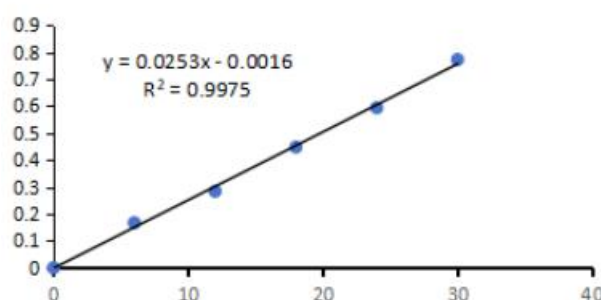
③ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (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℃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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (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 V_1 (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 V_1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 0.0253x - 0.0016$; x 为标准品摩尔质量 (nmol), y 为 ΔA 。



2、按照质量计算：

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

$$\alpha\text{-Afa 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0016) \div 0.0253] \div (W \times V_1 \div V) \div T$$

$$= 32.94 \times (\Delta A + 0.0016) \div W$$

3、按蛋白浓度计算：

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

$$\alpha\text{-Afa 活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0016) \div 0.0253] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T$$

$$= 32.94 \times (\Delta A + 0.0016) \div C_{pr}$$

4、按照液体体积计算：

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

$$\alpha\text{-Afa 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0016) \div 0.0253] \div V_1 \times D \div T$$

$$= 32.94 \times (\Delta A + 0.0016) \times D$$

5、按细菌/细胞密度计算：

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

$$\alpha\text{-Afa 活性}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0016) \div 0.0253] \div (V_1 \div V \times 500) \times D \div T$$

$$= 0.066 \times (\Delta A + 0.0016) \times D$$

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----139.11 500---细胞数量, 万;
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, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/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 100uL, 加入 900uL 蒸馏水, 混匀得到 0.1mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
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 管加入:

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		40
提取液	115	115
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, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		