

α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Af) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10742

规格: 100T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4°C 保存
试剂一	粉剂×2 支	-20°C 保存
试剂二	液体 35 mL×1 瓶	4°C 保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4°C 保存

溶液的配制:

1、试剂一: 临用前取 1 支加入 1.37 mL 蒸馏水, 充分溶解, 用不完的试剂建议分装后-20°C 保存一周, 避免反复冻融。

2、标准品: 5 μ mol/mL 的对-硝基苯酚。

产品说明:

α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Arabinofuranosidase, α -L-Af) 属于糖基水解酶家族, 可以从含有阿拉伯糖残基的多聚物如阿拉伯木聚糖、阿拉伯聚糖和阿拉伯半乳聚糖等的非还原末端水解生成一个 L-阿拉伯糖分子。该酶在半纤维素降解以及果实的成熟软化过程中有着重要作用。

α -L-Af 分解对硝基苯基- α -L-阿拉伯呋喃糖苷生成对-硝基苯酚, 对-硝基苯酚在 400 nm 处有最大吸收峰, 通过测定 400 nm 处吸光值变化可计算得 α -L-Af 活性。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、EP 管。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1、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 0.1 g 组织, 加入 1 mL 提取液) 进行冰浴匀浆, 然后 15000 g, 4°C, 离心 10 min, 取上清 (若为绿色植物的茎、叶、芽等组织, 建议将上清用提取液稀释 5 倍后检测; 若为果肉等组织, 上清可直接检测或根据预测定结果稀释相应倍数后检测) 置于冰上待测。

2、细胞或细菌: 先收集细胞或细菌到离心管内, 离心后弃上清; 按照细胞或细菌数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万个细胞或细菌加入 1 mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞或细菌 (功率 200 W, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3 min); 然后 15000 g, 4°C, 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

3、液体：直接检测。

二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 400 nm，蒸馏水调零。

2、将 5 μmol/mL 的对-硝基苯酚标准液用提取液稀释为 500、250、125、62.5、31.25、15.625 nmol/mL 的标准溶液备用。

3、操作表：(在 1.5 mL 离心管中)

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	标准管	空白管
试剂一	-	40	-	-
蒸馏水	40		40	100
样本	60	60	-	-
标准溶液	-	-	60	-
混匀，37°C水浴或恒温培养箱中准确反应 30 min				
试剂二	200	200	200	200
混匀，吸取 200 μL 于微量玻璃比色皿或 96 孔板中，测定 400 nm 处吸光值 A，分别记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管、A 空白管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每个测定管需设一个对照管，标准曲线只需检测 1-2 次。				

三、α-L-Af 活性计算

1、标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y = kx + b$ ，将 ΔA 代入方程得到 x (nmol/mL)。

2、α-L-Af 活性的计算：

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义：每 mg 蛋白每小时产生 1 nmol 对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-L-Af 酶活 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 2x \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

酶活定义：每 g 样本每小时产生 1 nmol 对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-L-Af 酶活 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{提取}} \div W \div T = 2x \div W$$

(3) 按照细胞或细菌数量计算

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每小时产生 1 nmol 对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-L-Af 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{提取}} \div \text{细胞数量 (万个)} \div T = 2x \div \text{细胞数量 (万个)}$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义：每 mL 样本每小时产生 1 nmol 对-硝基苯酚为 1 个酶活力单位。

$$\alpha\text{-L-Af 酶活 (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 2x$$

V 提取：提取液体积，1 mL；V 样：加入的样本体积，0.06 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g；T：反应时间，30 min。

注意事项：

1、A 或 ΔA 大于 1.2 时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定。

- 2、正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，若浓度过高，建议将样本用提取液稀释适当倍数后再进行测定，并在计算公式中乘以稀释倍数；若浓度过低，建议在样本提取时增加组织质量。
- 3、加入试剂二后，建议 5 min 内读取 OD 值。

实验实例：

- 1、取 0.1g 黑麦穗进行样本处理，取上清稀释 2 倍后，按测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.642 - 0.276 = 0.366$ ，带入标准曲线 $y = 0.0024x - 0.0045$ ，计算 $x = 154.375$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\alpha\text{-L-Af 酶活 (U/g 质量)} = 2x \div W \times 2 \text{ (稀释倍数)} = 2 \times 154.375 \div 0.1 \times 2 \text{ (稀释倍数)} = 6175 \text{ U/g 质量}$ 。