

α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Arabinofuranosidase, α -Afa) 试剂盒说明书 (货号: ADS-W-TDX035 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 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 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:

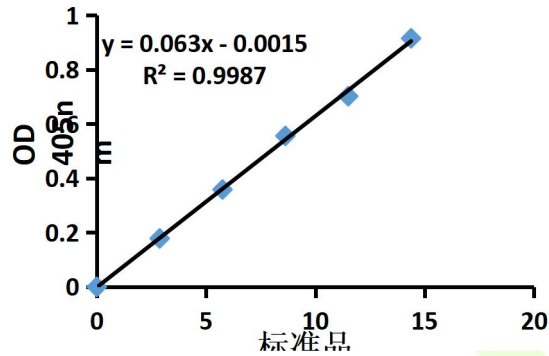
- ① 酶标仪预热 30min 以上, 温度设定 37°C, 波长设定为 405nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μ L)	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 200 μ L 至 96 孔板中, 于 405nm 处测定吸光值 A, $\Delta A = A$ 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 20 μ L, 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。