

α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α-L-Arabinofuranosidase, α-L-Af)

试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

α-L-Af 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。

测定原理:

α-L-Af 分解对硝基酚阿拉伯呋喃糖苷生成对-硝基苯酚, 后者在 400nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率来计算 α-L-Af 活性。

自备用品:

酶标仪/可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔板/微量石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存; 临用前加入 2.5mL 蒸馏水, 充分溶解备用; 用不完的试剂仍-20℃ 保存。

试剂二: 液体 4mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 液体 13mL×1 瓶, 4℃ 保存。

粗酶液提取:

1、细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 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 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 15000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、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 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。15000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

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

2、样本测定 (在 EP 管或 96 孔板中依次加入下列试剂):

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	25	
蒸馏水		25
试剂二	35	35
样本	10	10

迅速混匀, 放入 37℃ 保温 30min

试剂三	130	130
-----	-----	-----

充分混匀, 400nm 处测定吸光值 A, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

α-L-Af 活性计算：**a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下**

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.00585x - 0.0027$ ；x 为标准品浓度 (nmol/mL)，y 为吸光值。

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每 min 产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-L-Af 活性(nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T \\ = 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-L-Af 活性(nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-L-Af 活性(nmol/min/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 0.08 \times (\Delta A + 0.0027)$$

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.07mL; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.01mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; T: 反应时间, 30min。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0039x - 0.0027$ ；x 为标准品浓度 (nmol/mL)，y 为吸光值。

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-L-Af 活性(nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T \\ = 59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-L-Af 活性(nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-L-Af 活性(nmol/min/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 0.12 \times (\Delta A + 0.0027)$$

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; V 反总: 反应体系总体积, 0.07mL; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.01mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; T: 反应时间, 30min。