α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性检测试剂盒

α -L-Af Assay Kit

微量法

产品编号：AK396M

产品规格：100T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES396	100mL× 1 瓶	4℃保存；
AK396-A	粉剂×1 瓶	-20℃保存；临用前加入 2.5mL 蒸馏水，充分溶解备用；剩余试剂-20℃保存
AK396-B	4mL×1 瓶	4℃保存
AK396-C	13mL×1 瓶	4℃保存
AK396-标准品	1mL×1 支	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶(α-L-Arabinofuranosidase, 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。

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。

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）：ES396 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES396），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）：ES396 体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL ES396），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. 将 5 μmol/mL 的标准液用提取液稀释为 2.5、2、1.5、1、0.5、0.25、0.1 μmol/mL 的标准溶液备用。
3. 样本测定（在 EP 管或 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称	对照管（μL）	测定管（μL）	标准管（μL）	空白管（μL）
AK396-A		25		
蒸馏水	25		60	70
AK396-B	35	35		
样本	10	10		
标准溶液			10	
迅速混匀，放入 37℃保温 30min				

AK396-C	130	130	130	130
充分混匀， 400nm 处测定吸光值 A，分别记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管、A 空白管。计算 ΔA=A 测定管-A 对照管，ΔA 标准=A 标准管-A 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 。				

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 带 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。

α-L-Af 酶活（U/mg prot）=x×V 提取÷（V 提取×Cpr）÷T=2x÷Cpr

（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。

α-L-Af 酶活（U/g 质量）=x×V 提取÷W÷T=2x÷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。

α-L-Af 酶活（U/104 cell）=x×V 提取÷细胞数量（万个）÷T=2x÷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。

α-L-Af 酶活（U/mL）＝x×V 样÷V 样÷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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)