

α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶（α-L-Af）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYFA7-C24	α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶（α-L-Af）活性 检测试剂盒	24T	常量法
AYFA7-C48		48T	

一、测定意义：

α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶（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。

二、测定原理：

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。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
	试剂二配制：用时每瓶粉剂加入试剂一 6mL ，混匀充分溶解。		
试剂三	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品 (1mg/mL)	液体 1mL×1 支	液体 1mL×2 支	2-8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

1、组织：按照组织质量（g）:提取液(mL)为 1:10 的比例（建议称取0.1 g 组织，加入 1 mL提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。

2、细菌、细胞：按照细胞数量 10^4 个：提取液体积（mL）500~1000:1 的比例（建议500万细胞加入1 mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3s，间隔 s，总时间3 min），5000 rpm，4℃离心10min，取上清置冰上待测。

3、血清（浆）等液体：直接测定。

测定步骤

1. 分光光度计预热30min 以上，调节波长至405nm，蒸馏水调零。
2. 测定前将试剂恢复至常温；

3. 将1mg/mL标准品用蒸馏水依次稀释至0、10、20、40、60、80、100 μ g/mL标准液备用；

4. 操作表：

试剂名称	测定管	对照管	空白管	标准管
样品 (μ L)	50	50	-	-
蒸馏水 (μ L)	-	-	50	-
不同浓度标准液 (μ L)	-	-	-	50
试剂一 (μ L)	500	500	500	500
试剂二 (μ L)	100	-	100	100
混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。				
试剂三 (μ L)	500	500	500	500
试剂二 (μ L)	-	100	-	-
混匀，静置 3min，空白管调零，于波长 405nm 测定各管吸光度，分别记为 A 测定管、A 对照管、A 空白管、A 标准管， ΔA 测定=A 测定管 - A 对照管， ΔA 标准=A 标准管 - A 空白管。				

五、 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Af) 活性计算：

1、标准曲线绘制：

以吸光度值为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线 $y=kx+b$ ，x 为吸光度值，y 为标准品浓度浓度 (μ g/mL)。根据标准曲线，将 ΔA 测定带入公式计算出样本浓度 (y, μ g/mL)；

2、血清样本 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Af) 计算：

单位定义：每毫升血清每分钟催化产生 1 μ g 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式： α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Af) (U/mL) = $y \div T$

3、组织、细胞样本 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Af) 计算：

(1)按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 μ g 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式： α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Af) (U/mg prot) = $y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$

(2)按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织催化产生 1 μ g 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式： α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Af) (U/g) = $y \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

(3)按照细菌或细胞数量计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 μ g 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式： α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Af) (U/10⁴ cell) = $y \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05mL;

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL;

T: 反应时间, 30min;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

500: 细胞/细菌数, 500 万;

六、 注意事项:

- 1、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;
- 2、试剂二需要密封避光保存。