

## 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-M48	α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶（α-L-Af）活性 检测试剂盒	48T	微量法
AYFA7-M96		96T	

### 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(48)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 12mL×1 瓶	液体 24mL×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 12mL×1 瓶	液体 24mL×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. 酶标仪预热30min 以上，调节波长至405nm。
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 $\mu$ g/mL标准液备用；

4. 操作表（96孔酶标板中）：

试剂名称	测定管	对照管	空白管	标准管
样品（ $\mu$ L）	10	10	-	-
蒸馏水（ $\mu$ L）	-	-	10	-
不同浓度标准液（ $\mu$ L）	-	-	-	10
试剂一（ $\mu$ L）	100	100	100	100
试剂二（ $\mu$ L）	20	-	20	20
混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 15min。				
试剂三（ $\mu$ L）	100	100	100	100
试剂二（ $\mu$ L）	-	20	-	-
混匀，静置 3min，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， $\Delta A$ 测定=A 测定管 - A 对照管， $\Delta A$ 标准=A 标准管 - A 空白管。				

### 五、 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶（ $\alpha$ -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（ $\mu$ g/mL）。根据标准曲线，将  $\Delta A$  测定带入公式计算出样本浓度（y， $\mu$ g/mL）；

#### 2、血清样本 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶（ $\alpha$ -L-Af）计算：

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

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

#### 3、组织、细胞样本 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶（ $\alpha$ -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 $\mu$ g 对硝基酚的量为一个活力单位。

**计算公式：** $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶（ $\alpha$ -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 $\mu$ g 对硝基酚的量为一个活力单位。

**计算公式：** $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶（ $\alpha$ -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 $\mu$ g 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式： $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 ( $\alpha$ -L-Af) (U/10<sup>4</sup> 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, 0.01mL;

$V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 mL;

T: 反应时间, 15min;

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。