

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

试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制:

提取液: 液体 50mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存; 临用前每瓶加入 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 15mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 液体 50mL×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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 400nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定 (在 EP 管中依次加入下列试剂):

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
试剂一	200	
蒸馏水		200
试剂二	250	250
样本	50	50

迅速混匀, 放入 37℃ 准确水浴 30min

试剂三	1000	1000
-----	------	------

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:

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。

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

(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。

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

C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.5mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL; $V_{\text{样总}}$: 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。