（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K762-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(400-420 nm)

Elabscience®α-L-岩藻糖苷酶(AFU)比色法测试盒

α-L-Fucosidase (AFU) Acitivity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆或动物组织样本中α-L-岩藻糖苷酶(AFU)的活力。

检测原理

α-L-岩藻糖苷酶(AFU)是一种存在于生物体内的酸性水解酶，广泛存在于生物体组织细胞、血液和体液中，参与糖蛋白、糖脂和寡糖的代谢，并在细胞分化、凋亡、炎症和宿主-病原体相互作用中发挥着关键作用，α-L-岩藻糖苷酶催化无色的底物硝基苯-α-L-岩藻糖苷水解生成黄色的硝基苯酚，在 405 nm 波长处有显著吸收峰，其吸光度与生成的硝基苯酚含量呈正相关。通过测定 405 nm 波长吸光度，可计算出样本中α-L-岩藻糖苷酶活力。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	工作液 (Working Solution)	12 mL×1 瓶	25 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	5 mmol/L 标准品 (5 mmol/L Standard Solution)	1 mL×1 支	1 mL×2 支	2-8°C避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(400-420 nm，最佳检测波长 405 nm)

试剂准备

① 检测前，将试剂二和试剂三平衡至室温；试剂一置于冰盒待用。

② 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.5**	**1.0**	**1.5**	**2.0**	**3.0**	**4.0**	**5.0**
5 mmol/L 标准品(μL)	0	10	20	30	40	60	80	100
试剂一(μL)	100	90	80	70	60	40	20	0

样本准备

① 样本处理

血清和血浆样本：可直接用于检测。如果样本中有沉淀，可在4°C条件下5000 × g离心5 min，取澄清部分置于冰上待测。

组织样本：匀浆液为试剂一，匀浆后取上清液置于冰上待测，如仍有沉淀，再次离心。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围(0.5-80 U/L)，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	**稀释倍数**	**样本**	**稀释倍数**
人血清	不稀释	大鼠血浆	不稀释
10%大鼠肝组织	1-3	10%小鼠肝组织	1-3
10%大鼠脾组织	不稀释	10%小鼠肾组织	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

① 注意血清样本应澄清，溶血、高脂、乳糜样本会影响检测结果。

② 注意尽量使用新鲜样本。

操作步骤

① 标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品，加入相应的酶标孔中；
测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①各孔中加入 200 μL 试剂二。

③ 振板，混匀，37°C 孵育 15 min，酶标仪于波长 405 nm 处测定各孔吸光度 A_1。

④ 37°C 孵育 30 min，酶标仪于波长 405 nm 处测定各孔吸光度 A_2。

操作表

	标准孔	**测定孔**
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
试剂二(μL)	200	200
振板，混匀，37°C 孵育 15 min，酶标仪于波长 405 nm 处测定各孔吸光度 A_1。		
37°C 孵育 30 min，酶标仪于波长 405 nm 处测定各孔吸光度 A_2。		

注：标准孔使用 A_2 绘制标准曲线，测定孔使用 $\Delta A = A_2 - A_1$ 计算岩藻糖苷酶(AFU)活力。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

血清或血浆样本中α-L-岩藻糖苷酶(AFU)活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每升血清样本每分钟水解底物生成 1 μmol 2-氯-4-硝基苯酚所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{AFU 活力 (U/L)} = \frac{(\Delta A - b)}{a} \div T \times 1000^* \times f$$

组织样本中α-L-岩藻糖苷酶(AFU)活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织蛋白样本每分钟水解底物生成 1 μmol 2-氯-4-硝基苯酚所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{AFU 活力 (U/gprot)} = \frac{(\Delta A - b)}{a} \div T \times 1000^* \div C_{pr} \times f$$

注解:

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标准曲线斜率

b：标准曲线截距

ΔA：测定孔的绝对 OD 值，$A_2 - A_1$

T：反应时间，30 min

1000*：单位换算 1 mmol = 1000 μmol

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr}：组织样本的蛋白浓度，gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

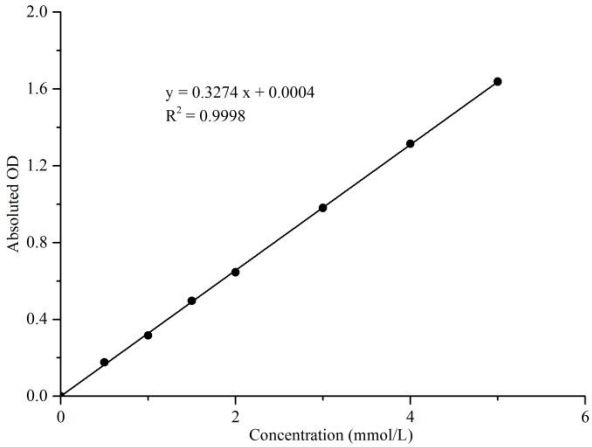
检测范围	0.5-80 U/L	**平均批间差**	8.4 %
灵敏度	0.5 U/L	**平均批内差**	3.7 %
平均回收率	97 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL，按照操作步骤进行实验，不同浓度2-氯-4-硝基苯酚标准品OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	**0**	**0.5**	**1**	**1.5**	**2**	**3**	**4**	**5**
OD 值	0.093	0.268	0.421	0.591	0.715	1.072	1.410	1.739
	0.092	0.269	0.398	0.588	0.762	1.073	1.404	1.722
平均 OD 值	0.093	0.269	0.410	0.590	0.739	1.073	1.407	1.731
绝对 OD 值	0.000	0.176	0.317	0.497	0.646	0.980	1.314	1.638

② 绘制标曲(如下图)：



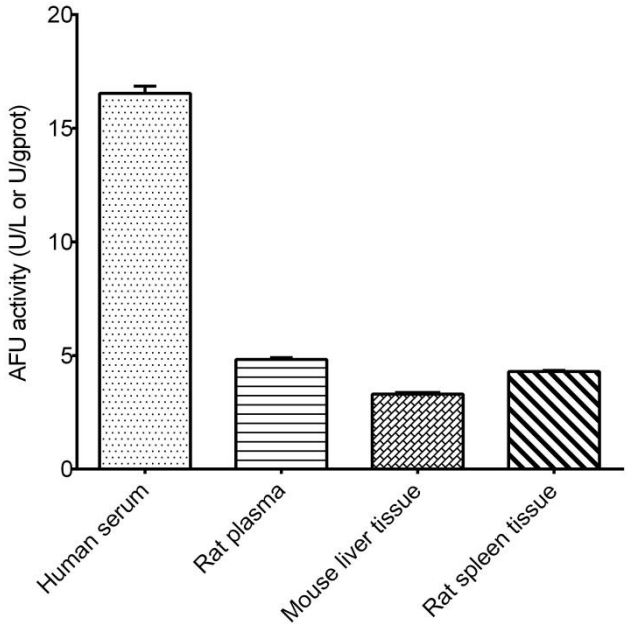
附录2 实例分析

例如检测人血清样本(数据仅供参考)：

取人血清样本20 μL，按操作表操作，结果如下：标准曲线：y = 0.2492 x - 0.0023，测定孔A_1为0.213，A_2为0.338，ΔA = 0.338 - 0.213 = 0.125，计算结果为：

$$\text{AFU 活力 (U/L)} = \frac{0.125 + 0.0023}{0.2492} \div 30 \times 1000 = 17.03\ \text{U/L}$$

按说明书操作，测定人血清(加样量20 μL)、大鼠血浆(加样量20 μL)、小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白含量7.47 gprot/L，加样量20 μL)、大鼠脾组织(10%匀浆蛋白浓度为3.32 gprot/L，加样量为20 μL)中的AFU酶活(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
检测组织样本时，测定孔中有沉淀	样本未能完全离心	对组织样本进行适当稀释
		组织匀浆样本离心后静置一段时间再次离心

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。