

α -半乳糖苷酶 (α -GAL) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10467

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 80 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂一: 临用前每瓶加入 5 mL 双蒸水, 充分溶解备用; 用不完的试剂仍-20°C保存;
- 2、标准品: 5 μ mol/mL 的对硝基苯酚溶液。

产品说明:

α -GAL (EC 3.2.1.22)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 能专一地催化 α -半乳糖苷键的水解, 主要参与棉子糖、水苏糖、蜜二糖和半乳甘露聚糖等半乳糖苷的降解。 α -GAL对于植物种子的萌发至关重要, 种子萌发初期, 其催化产生的D-半乳糖通过糖酵解途径迅速转化和消耗, 为种子的萌发提供最初的能量来源, 后期则主要参与细胞壁储藏多糖水解。

α -GAL分解对-硝基苯- α -D-吡喃半乳糖苷生成对-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 -GAL活性。

注意: 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。

需自备的仪器和用品:

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/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1、细菌或培养细胞的处理 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清, 按照每 1000 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 15000g, 4°C, 离心 20 分钟, 取上清, 置冰上待测。

2、组织的处理: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆; 15000g, 4°C, 离心 20min, 取上清, 置冰上待测。

二、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、标准液的处理：用蒸馏水将标准液稀释至200、100、50、25、12.5、6.25、0nmol/mL。

3、样本测定（在1.5mLEP管中依次加入下列试剂）

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管	标准管
试剂一	200		
蒸馏水		200	
试剂二	250	250	
样本	50	50	
迅速混匀，放入37°C准确水浴30min			
标准液			500
试剂三	1000	1000	1000
充分混匀，室温静置2min后，400nm处测定吸光值A。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。			

三、 α -GAL活性计算

1、标准曲线的建立：

根据标准管的吸光度（y，各标准管吸光值减去浓度为零的标准管的吸光值）和浓度（x，nmol/mL）建立标准曲线，将 ΔA （y）带入标准曲线中，计算样本生成的产物量x（nmol/mL）。

2、 α -GAL活性计算

（1）按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg 组织蛋白每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-GAL活力(U/mg prot)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 20x \div C_{\text{pr}}$$

蛋白浓度需要另外测定。

（2）按样本质量计算

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力单位。

$$\alpha\text{-GAL活力(U/g 质量)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 20x \div W$$

（3）按细菌或细胞数量计算

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力单位。

$$\alpha\text{-GAL活力(U/10}^4 \text{ cell)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (1000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.02x$$

Cpr: 样本蛋白质浓度，mg/mL；V反总: 反应体系总体积，0.5mL；V样: 加入反应体系中样本体积，0.05mL；V样总: 加入提取液体积，1mL；W: 样本质量，g；1000: 细胞或细菌总数，1000万；T: 反应时间，0.5h。