

## $\alpha$ -半乳糖苷酶 ( $\alpha$ -Galactosidase, $\alpha$ -GAL) 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：

$\alpha$ -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 $\alpha$ 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。 $\alpha$ -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。

### 测定原理：

$\alpha$ -GAL 分解对-硝基苯- $\alpha$ -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 $\alpha$ -GAL 活性。

### 组成：

产品名称	GMS030-50T/24S	Storage
提取液：液体	50ml	4°C
试剂一：粉剂	1 瓶	-20°C
试剂二：液体	15ml	4°C
试剂三：液体	50ml	4°C
说明书	一份	

试剂一：粉剂×1 瓶，-20°C 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°C 保存。

### 自备仪器和用品：

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、冰和蒸馏水。

### 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°C 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°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

### 测定步骤：

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司，保留一切权利



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 (μl)	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°C 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-GAL 活性计算：

标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.00543x - 0.0027$ ；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 组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-GAL 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-GAL 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\alpha\text{-GAL 活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.123 \times (\Delta A + 0.0027)$$

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；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/ml；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万；T：反应时间，30min。

