

α -半乳糖苷酶 (α -Galactosidase, α -GAL) 试剂盒说明书

微量法 100管/48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 -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。

测定原理:

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。

组成:

产品名称	GMS031-100T/48S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂二: 液体	4ml	4°C
试剂三: 液体	13ml	4°C
说明书	一份	

自备仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂一: 粉剂 \times 1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 2.5ml 蒸馏水, 充分溶解备用; 用不完的试剂仍-20°C 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°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。

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



测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定（在 EP 管或 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μl)	测定管	对照管
试剂一	25	
蒸馏水		25
试剂二	35	35
样本	10	10

迅速混匀，放入 37°C 保温 30min

试剂三	130	130
-----	-----	-----

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:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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 组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

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

$$= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

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

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

$$= 0.08 \times (\Delta A + 0.0027)$$

V 反总：反应体系总体积，0.07ml；V 样：加入反应体系中样本体积，0.01ml；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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0039x - 0.0027$; 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性单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

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



$$=59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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性单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 0.12 \times (\Delta A + 0.0027)$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.07ml; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.01ml; 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。

