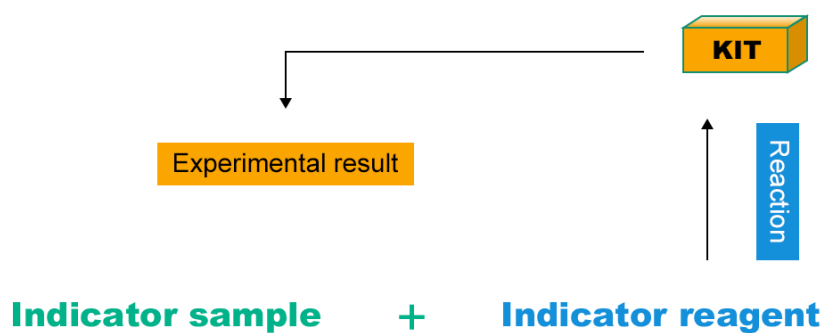


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0430

Size: 100T/48S

α -半乳糖苷酶 (α -GAL) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL $\times$ 1 瓶	4°C 保存	
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。
试剂二	液体 4mL $\times$ 1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 13mL $\times$ 1 瓶	4°C 保存	

五、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。

六、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（ μ L）	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℃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。

七、 α -GAL 活性计算：

- 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 $y = 0.32x - 0.0027$ ；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 组织蛋白每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性 (nmol/h/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.32 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 43.8 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\alpha\text{-GAL 活性 (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.32 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 43.8 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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。

$$\alpha\text{-GAL 活性 (nmol/h/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.32 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 0.0876 \times (\Delta A + 0.0027)$$

C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.07mL； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：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，0.5h。

● 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 $y = 0.16x - 0.0027$ ； 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 组织蛋白每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性 (nmol/h/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.16 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 87.6 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\alpha\text{-GAL 活性 (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.16 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 87.6 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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。

$$\alpha\text{-GAL 活性 (nmol/h/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.16 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 0.1752 \times (\Delta A + 0.0027)$$

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；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；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万；T：反应时间，0.5h。