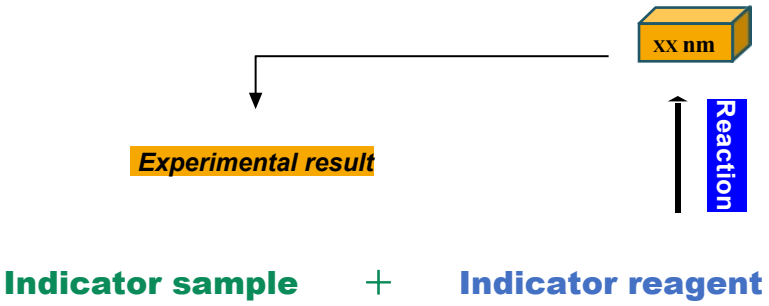
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0430 规格：100管/48样

α-半乳糖苷酶（α-Galactosidase，α-GAL）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

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。

自备用品：

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。

试剂组成和配制：

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×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃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℃保存。
试剂二	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂三	液体 13mL×1 瓶	4℃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℃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。

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℃保温30min		
试剂三	130	130

充分混匀， 400nm处测定吸光值 A，计算 ΔA=A 测定-A 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 =0.32x-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。

α-GAL 活性(nmol/h/mg prot)=[(ΔA+0.0027) ÷0.32×V 反总]÷(V 样×Cpr)÷T

=43.8×(ΔA+0.0027)÷Cpr

（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。

α-GAL 活性(nmol/h/g 鲜重)=[(ΔA+0.0027)÷0.32×V 反总]÷(W×V 样÷V 样总)÷T

=43.8×(ΔA+0.0027) ÷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。

α-GAL 活性(nmol/h/10^4cell) =[(ΔA+0.0027)÷0.32×V反总]÷(500×V样÷V样总)÷T

=0.0876×(ΔA +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。

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=0.16x-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。

α-GAL 活性(nmol/h/mg prot)=[(ΔA+0.0027)÷0.16×V反总]÷(V 样×Cpr)÷T

=87.6×(ΔA+0.0027)÷Cpr

（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。

α-GAL 活性(nmol/h/g 鲜重)=[(ΔA+0.0027)÷0.16×V 反总]÷(W×V 样÷V 样总)÷T

=87.6×(ΔA+0.0027) ÷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。

α-GAL活性(nmol/h/10^4cell) =[(ΔA+0.0027)÷0.16×V反总]÷(500×V样÷V样总)÷T

=0.1752×(ΔA +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。