

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

(微板法 48 样)

## 一、产品简介:

α-半乳糖苷酶(α-GAL, EC 3.2.1.22)可特异性地水解多糖、糖脂、糖蛋白中糖链末端的 α-半乳糖苷键。在人、动物、植物、微生物体内均存在。在食品饲料和医药等领域中有着广泛的应用前景。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法, α-GAL 分解对-硝基苯-α-D-吡喃半乳糖苷生成黄色的对-硝基苯酚 (PNP), 后者在 405nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率来计算 α-GAL 活性。

## 二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C保存	临用前加 1.5ml 水。
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液 20mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

## 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

## 四、α-半乳糖苷酶 (α-GAL) 活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

### 1、样本制备:

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 再 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清作为粗体液, 置于冰上待测。

**【注】:** 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取

② 细菌或细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 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); 再 12000 rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

**【注】:** 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量( $10^4$  个):提取液体积 (mL)为 500~1000:1 比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

### 2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 温度设定 37°C, 波长设定为 405nm。

② 在 EP 管中依次加入:

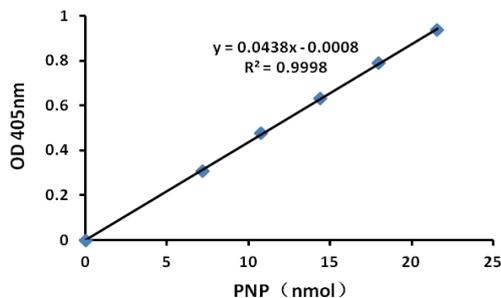
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	25	
蒸馏水		25
试剂二	35	35
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	180	180

混匀，取 200 $\mu$ L 转移到 96 孔板中，405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A$  测定 - A 对照。每个测定管需设一个对照管。

【注】：若  $\Delta A$  过小，可以延长保温时间（如：40min 或更长），或增加样本上样量 V1（如增至 30 $\mu$ L，则试剂三相应减少），则改变后的 T 或 V1 需重新代入计算公式计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0438x - 0.0008$ ：x 是标准品 PNP 的质量（nmol），y 是  $\Delta A$ 。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 对-硝基苯酚(PNP)定义为一个酶活单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0438] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D \\ = 76.1 \times (\Delta A + 0.0008) \div Cpr \times D$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚(PNP)定义为一个酶活单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0438] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 76.1 \times (\Delta A + 0.0008) \div W \times D$$

4、按细菌或细胞密度计算：

单位定义：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。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0438] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 0.152 \times (\Delta A + 0.0008) \times D$$

5、按液体体积：

单位定义：每毫升液体每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚(PNP)定义为一个酶活单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0438] \div V1 \div T \times D = 76.1 \times (\Delta A + 0.0008) \times D$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.01mL；

W---样本质量，g；

T---反应时间，30min；

PNP 对分子质量---139.11；

500---细胞或细菌数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入：10 $\mu$ L 标准品+25 $\mu$ L 蒸馏水+35 $\mu$ L 试剂二+180 $\mu$ L 试剂三，混匀，取 200 $\mu$ L 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。