

## α-半乳糖苷酶 (α-GAL) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC2570

规格：50T/24S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	粉剂×2 瓶	-20°C保存
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 80 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8°C保存

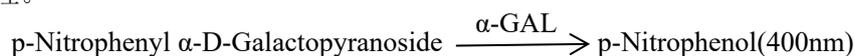
溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前取 1 瓶加入 2.67 mL 蒸馏水，充分溶解备用；用不完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、标准品：5 μmol/mL 的对硝基苯酚溶液。

**产品说明：**

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。

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。



**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、超声破碎仪、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

**操作步骤：**

**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

1、细菌或培养细胞的处理 收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 1000 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），15000g，4°C，离心 20min，取上清，置冰上待测。

2、组织的处理：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆；15000g，4℃，离心 20min，取上清，置冰上待测。

## 二、测定步骤

1、分光光度计预热30min以上，调节波长至400nm，蒸馏水调零。

2、标准液的稀释：将标准液用蒸馏水稀释至200、100、50、25、12.5、6.25、0nmol/mL标准溶液待测。

3、标准液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 (nmol/mL)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 (nmol/mL)
1	5000	80	1920	200
2	200	1000	1000	100
3	100	1000	1000	50
4	50	1000	1000	25
5	25	1000	1000	12.5
6	12.5	1000	1000	6.25
7	6.25	0	1000	0 (空白管)

备注：实验中每个标准管需 500μL 标准溶液。

4、样本测定（在1.5mLEP管中依次加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管
试剂一	200		
蒸馏水		200	
试剂二	250	250	
样本	50	50	
迅速混匀，放入37℃水浴锅/恒温培养箱中准确反应30min			
标准液			500
试剂三	1000	1000	1000
充分混匀，室温静置2min后，于400nm处测定吸光值A，分别记为A测定管、A对照管、A标准管、A空白管。计算ΔA测定=A测定管-A对照管，ΔA标准=A标准管-A空白管。每个测定管需设一个对照管。标准曲线和空白管只需测1-2次。			

## 三、α-GAL活性计算

1、标准曲线的建立：

根据标准管的吸光度（y，ΔA标准）和浓度（x，nmol/mL）建立标准曲线，将ΔA（y，ΔA测定）带入标准曲线中，计算样本生成的产物量x（nmol/mL）。

2、α-GAL活性计算

(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力单位。

$$\alpha\text{-GAL活力(U/mg prot)}=(x \times V_{\text{反总}}) \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T=20x \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

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力单位。

$$\alpha\text{-GAL活力(U/g 质量)}=(x \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T=20x \div W$$

(3) 按细菌或细胞数量计算

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力单位。

$$\alpha\text{-GAL活力(U/10}^4\text{ cell)}=(x\times V\text{反总})\div(1000\times V\text{样}\div V\text{样总})\div T=0.02x$$

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL, 蛋白浓度需要另外测定; 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; W: 样本质量, g; 1000: 细胞或细菌总数, 1000万; T: 反应时间, 0.5h。

**注意事项:**

提取液中含有使蛋白变性的成分, 故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。

**相关系列产品:**

BC0340/BC0345 糖原含量检测试剂盒

BC0360/BC0365  $\beta$ -1,3葡聚糖酶 ( $\beta$ -1,3-GA) 活性检测试剂盒

BC2510/BC2515 海藻糖酶 (THL) 活性检测试剂盒

