

## α-半乳糖苷酶(α-GAL)试剂盒说明书

### α-galactosidase Assay Kit

微量法

货号: AK034

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

	规格	储存条件
提取液 ES02	液体 100mL×1 瓶	4℃保存
AK034-A	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-20℃分装保存 4 周, 避免反复冻融。
AK034-B	液体 4mL×1 瓶	4℃保存
AK034-C	液体 15mL×1 瓶	4℃保存
AK034-标准品 (5 μmol/mL)	液体 1mL×1 支	4℃保存

简介:

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。

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、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

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 ES02 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 ES02), 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 20min, 取上清, 置冰上待测。
2. 组织: 按照组织质量 (g): 提取液 ES02 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 ES02), 进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 20min, 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. 标准液的处理: 用蒸馏水将标准液稀释至 200、100、50、25、12.5、6.25、0nmol/mL。
3. 样本测定(在 EP 管或 96 孔板中依次加入下列试剂):

试剂名称(ul)	测定管	对照管	标准管
AK034-A	25		
蒸馏水		25	
AK034-B	35	35	
样本	10	10	
迅速混匀, 放入 37℃保温 30min			

标准品			70
AK034-C	130	130	130
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 $\Delta A$ 测定=A 测定管-A 对照管， $\Delta A$ 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。			

#### **$\alpha$ -GAL 活性计算：**

##### 1. 标准曲线的建立：

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

##### 2. $\alpha$ -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性单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性(U/mg prot)} = [x \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 14x \div \text{Cpr}$$

###### (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。

$$\alpha\text{-GAL 活性(U/g 鲜重)} = [x \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 14x \div W$$

###### (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。

$$\alpha\text{-GAL 活性(U/10}^4\text{cell)} = [x \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.028x$$

注：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。

#### **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。