

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

微量法 100 管/48 样

注 意：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：

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 (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。

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 $y = 0.00585x - 0.0027$; 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 组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div W\end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 0.08 \times (\Delta A + 0.0027)\end{aligned}$$

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; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; T: 反应时间, 30min。

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 $y = 0.0039x - 0.0027$; 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 组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div W\end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 0.12 \times (\Delta A + 0.0027)\end{aligned}$$

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; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; T: 反应时间, 30min。