

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

### 分光光度法 50 管/24 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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

#### 试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；临用前每瓶加入 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 15mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 50mL×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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零。

2、样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	200	
蒸馏水		200
试剂二	250	250
样本	50	50

迅速混匀，放入 37℃准确水浴 30min

试剂三	1000	1000
-----	------	------

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。

**$\alpha$ -GAL 活性计算：**

标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.00543x - 0.0027$ ；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力单位。

$$\alpha\text{-GAL 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{Cpr}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(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力单位。

$$\alpha\text{-GAL 活力}(\text{nmol}/\text{min} / \text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

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

$$\alpha\text{-GAL 活力}(\text{nmol}/\text{min} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.123 \times (\Delta A + 0.0027)$$

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；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。