

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

(货号: BP10279F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

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 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 支	4°C保存	1. 临用前加 2ml 水; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液 30mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、所需的仪器和用品:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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 分光光度计预热 30min 以上, 温度设定 37°C, 波长设定为 405nm, 蒸馏水调零。

- ② 在 EP 管中依次加入:

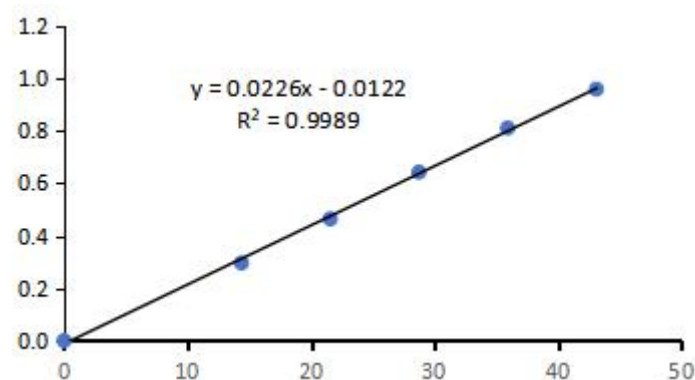
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	20	20

试剂一	75	
蒸馏水		75
试剂二	115	115
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	540	540
混匀, 全部液体转移到 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 405nm 处测定吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定管需设一个对照管)。		

【注】：若 ΔA 过小, 可增加样本上样量 V1 (如增至 60 μ L, 则试剂三相应减少), 或延长保温时间 (如: 40min 或更长), 则改变后的 V1 或 T 需重新代入计算公式计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0226x - 0.0122$: x 是标准品 PNP 的质量 (nmol), y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 对-硝基苯酚(PNP)定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0122) \div 0.0226] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ = 73.75 \times (\Delta A + 0.0122) \div \text{Cpr} \times D$$

3、按样本鲜重计算:

单位定义: 每 g 组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚(PNP)定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0122) \div 0.0226] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 73.75 \times (\Delta A + 0.0122) \div W \times D$$

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。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0122) \div 0.0226] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 0.147 \times (\Delta A + 0.0122) \times D$$

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)定义为一个酶活性单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0122) \div 0.0226] \div V1 \div T \times D = 73.75 \times (\Delta A + 0.0122) \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL; V1---加入反应体系中样本体积, 0.02mL;

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 向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水，标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 300uL，加入 700uL 蒸馏水，混匀得到 0.3mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水	75	95
试剂二	115	115
试剂三	540	540
混匀，全部液体转移到 1mL 玻璃比色皿中，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		