

**$\alpha$ -半乳糖苷酶 ( $\alpha$ -Galactosidase,  $\alpha$ -GAL) 试剂盒说明书**

(货号: G0523F 分光法 24 样)

**一、产品简介:**

$\alpha$ -半乳糖苷酶( $\alpha$ -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 $\alpha$ -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,  $\alpha$ -GAL 分解对-硝基苯- $\alpha$ -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 $\alpha$ -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℃ 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	临用前加 2ml 水
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

**三、所需的仪器和用品:**

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

**四、 $\alpha$ -半乳糖苷酶 ( $\alpha$ -GAL) 活性检测:**

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, 然后 12000rpm, 4℃, 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 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 可见分光光度计预热 30min 以上, 温度设定 37℃, 波长设定为 405nm, 蒸馏水调零。

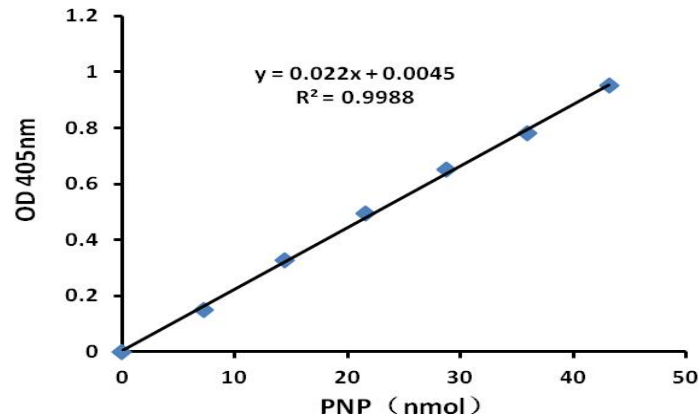
② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 ( $\mu$ 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℃保温 30min		
试剂三	540	540
混匀, 全部液体转移到 1mL 玻璃比色皿中, 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  $\Delta A$  过小, 可以延长保温时间 (如: 40min 或更长), 重新调整的反应时间值要代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.022x + 0.0045$ ；x 是标准品 PNP 的质量（nmol），y 是 $\Delta A$ 。



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。

$\alpha$ -GAL 活性(nmol/min/mg prot) =  $[(\Delta A - 0.0045) \div 0.022] \div (V1 \times Cpr) \div T = 75.76 \times (\Delta A - 0.0045) \div Cpr$

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。

$\alpha$ -GAL 活性(nmol/min/g 鲜重) =  $[(\Delta A - 0.0045) \div 0.022] \div (W \times V1 \div V) \div T = 75.76 \times (\Delta A - 0.0045) \div W$

4、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。

$\alpha$ -GAL 活性(nmol/min/mL) =  $[(\Delta A - 0.0045) \div 0.022] \div V1 \div T = 75.76 \times (\Delta A - 0.0045)$

V----加入提取液体积，1mL；

V1----加入反应体系中样本体积，0.01mL；

W----样本质量，g；

T----反应时间，30min；

PNP 对分子质量----139.11

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 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入：20 $\mu$ L 标准品+75 $\mu$ L 蒸馏水+115 $\mu$ L 试剂二+540 $\mu$ L 试剂三，混匀，全部液体转移到 1mL 玻璃比色皿中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。