

α -Galactosidase Activity Assay Kit

α -半乳糖苷酶 (α -GAL) 试剂盒说明书

货号: BN72096 | 方法: 微板法 | 规格: 48 样

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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 1.5mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液 20mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、 α -半乳糖苷酶 (α -GAL) 活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

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 打开酶标仪, 波长设定为 405nm。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	25	
蒸馏水		25
试剂二	35	35

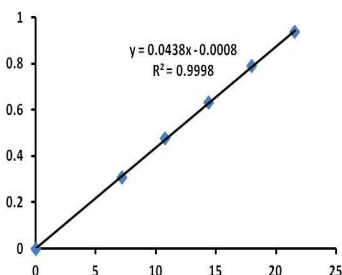
迅速混匀，37℃保温 30min		
试剂三	180	180
混匀，取 200μL 转移到 96 孔板中，405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定 -A 对照。每个测定管需设一个对照管。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0438x - 0.0008$ ：x 是标准品 PNP 的质量 (nmol)，y 是 ΔA 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 对-硝基苯酚(PNP)定义为一个酶活单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0438] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D$$

$$= 76.1 \times (\Delta A + 0.0008) \div Cpr \times D$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚(PNP)定义为一个酶活单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0438] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 76.1 \times (\Delta A + 0.0008) \div W \times D$$

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。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0438] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 0.152 \times (\Delta A + 0.0008) \times D$$

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)定义为一个酶活单位。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0438] \div V1 \div T \times D = 76.1 \times (\Delta A + 0.0008) \times D$$

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；

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。