

α -半乳糖苷酶 (α -Galactosidase, α -GAL) 试剂盒说明书**微量法 100 管/48 样**

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 \times 1 瓶,4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂一:粉剂 \times 1 瓶,-20 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 保存。

试剂二:液体 4mL \times 1 瓶,4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂三:液体 13mL \times 1 瓶,4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 保温 30min

试剂三	130	130
-----	-----	-----

充分混匀,400nm 处测定吸光值 A,计算 $\Delta A=A$ 测定-A 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。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

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

$$= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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。

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

$$= 0.08 \times (\Delta A + 0.0027)$$

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。

$$\alpha\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

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

$$= 59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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。

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

$$= 0.12 \times (\Delta A + 0.0027)$$

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。