α-半乳糖苷酶（α-Galactosidase, α-GAL）试剂盒说明书

（分光法 24 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 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、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℃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℃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 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：

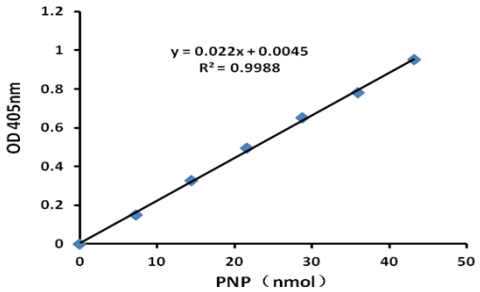
试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	75	
蒸馏水		75
试剂二	115	115
迅速混匀，37℃保温 30min		

试剂三	540	540
混匀，全部液体转移到 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，405nm 处测定吸光值 A，ΔA=A 测定-A 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 60μL，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 = 0.022x + 0.0045：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。

α-GAL 活性(nmol/min/mg prot)=[(ΔA-0.0045)÷0.022]÷(V1×Cpr)÷T×D

=75.76×(ΔA-0.0045)÷Cpr×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。

α-GAL 活性(nmol/min/g 鲜重)=[(ΔA-0.0045)÷0.022]÷(W×V1÷V)÷T×D

=75.76×(ΔA-0.0045)÷W×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。

α-GAL 活性(nmol/min/10^4cell)=[(ΔA-0.0045)÷0.022]÷(500×V1÷V)÷T×D

=0.152×(ΔA-0.0045) ×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。

α-GAL 活性(nmol/min/mL)=[(ΔA-0.0045)÷0.022]÷V1÷T×D=75.76×(ΔA-0.0045)×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。

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　把母液用蒸馏水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：20μL 标准品+75μL 蒸馏水+115μL 试剂二+540μL 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。