上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

α-半乳糖苷酶(α-GAL)活性检测试剂盒(可见分光光度法)

货号： R41754

规格： 50T

产品组成及保存条件：

	规格	储存条件
提取液ES02	液体50mL×1瓶	4℃保存
R41754-A	粉剂×1瓶	-20℃保存；临用前加入5mL蒸馏水，充分溶解备用； 用不完的试剂可-20℃分装保存4周，避免反复冻融。
R41754-B	液体15mL×1瓶	4℃保存
R41754-C	液体80mL×1瓶	4℃保存
R41754-标准品 (5 μmol/mL)	液体1mL×1支	4℃保存

简介：

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。

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。

需自备的仪器和耗材：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水

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 ES02 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 ES02），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℃离心 20min，取上清，置冰上待测。

2. 组织：按照组织质量（g）：提取液 ES02 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 ES02），进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 20min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零。

2. 标准液的处理：用蒸馏水将标准液稀释至 200、100、50、25、12.5、6.25 、0nmol/mL。

3. 样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称(ul)	测定管	对照管	标准管
R41754-A	200		
蒸馏水		200	
R41754-B	250	250	
样本	50	50	
迅速混匀，放入37℃保温30min			
标准品			500
R41754-C	1000	1000	1000
充分混匀，室温静置2min后，于400nm处测定吸光值A,分别记为A 测定管、A对照管、A标准管、A空白管。计算△A测定=A测定管-A对照管，△A标准=A标准管-A空白管。每个测定管需设一个对照管。标准 曲线和空白管只需测1-2次。			

α -GAL 活性计算：

1. 标准曲线的建立：

根据标准管的吸光度（y）和浓度（x,nmol/mL）建立标准曲线，将 ΔA（y）带入标准曲线中，计算样本生成的产物量 x（nmol/mL）。

2. α -GAL 活性计算

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

α-GAL 活性(U/mg prot) = [x×V 反总]÷(V 样×Cpr)÷T=20x÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

α-GAL 活性(U/g 鲜重) = [x×V 反总]÷(W×V 样÷V 样总)÷T=20x÷W

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

α-GAL 活性(U/10^4cell) = [x×V 反总]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=0.04x

注： Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；V 反总：反应体系总体积，0.5mL；V 样：加入反应体系中样本体积，0.05mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万；T：反应时间，0.5h。

注意事项：

提取液中含有使蛋白变性的成分，故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。