

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K630-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(395 - 415 nm)

Elabscience® α -半乳糖苷酶(α -Gal)比色法测试盒

α -Galactosidase (α -Gal) Acitivity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动植物组织样本中的 α -半乳糖苷酶(α -Gal)的酶活。

检测原理

α -半乳糖苷酶(α -Gal)能够催化动植物组织糖酵解过程中产生的物质形成最终产物, 该产物在 405 nm 有最大吸收峰。

本试剂盒检测组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 动物组织样本推荐使用 BCA 法(货号: E-BC-K318-M), 植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法(货号: E-BC-K168-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	50 mL×2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	促进剂 (Accelerant)	1.6 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	13 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	10 mmol/L 标准品溶液 (10 mmol/L Standard Solution)	0.3 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板		1 板
	96 孔覆膜		2 张
	样本位置标记表		1 张

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器: 酶标仪(395-415 nm, 最佳检测波长 405 nm)、涡旋混匀仪。

试剂: 双蒸水

试剂准备

① 检测前, 试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制:

取一支试剂二加入1.3 mL双蒸水, 溶解混匀, 未使用完的试剂可在-20 ℃保存4周。

③ 测定工作液的配制:

将试剂一: 试剂二工作液: 试剂三按20: 4: 3体积比混匀, 未使用完的试剂可在2-8 ℃避光保存一个月。

④ 对照工作液的配制:

将试剂一: 试剂三按8: 1体积比混匀, 未使用完的试剂可在2-8 ℃避光保存一个月。

⑤ 0.5 mmol/L标准品溶液的稀释:

取0.05 mL试剂五, 加入0.95 mL的双蒸水稀释, 稀释好的标准品溶液置于冰上避光待用, 现配现用, 8 h内使用有效。

⑥ 不同浓度标准品的稀释:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.1	0.15	0.2	0.3	0.4	0.45	0.5
0.5 mmol/L 标准品(μ L)	0	40	60	80	120	160	180	200
双蒸水(μ L)	200	160	140	120	80	40	20	0

样本准备

① 样本处理

组织样本: 按照组织样本质量(g): 试剂一体积(mL)=1:9的比例匀浆, 4 ℃, 10000 \times g离心10 min, 取上清待测, 留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.02-29.06 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%红薯组织	不稀释	10%香菇组织	不稀释
10%金针菇组织	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释

注：稀释液为试剂一。

操作步骤

- ① 标准孔：取 10 μL 不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标孔中。
测定孔/对照孔：取 10 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向①中测定孔、标准孔加入 135 μL 测定工作液，对照孔加入 135 μL 对照工作液。
- ③ 振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后，向各孔中加入 100 μL 试剂四，振板 5 s，酶标仪 405 nm 波长下检测各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品(μL)	10	--	--
待测样本(μL)	--	10	10
测定工作液(μL)	135	135	--
对照工作液(μL)	--	--	135
振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min			
试剂四(μL)	100	100	100
振板 5 s，酶标仪 405 nm 波长下检测各孔 OD 值			

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，动物组织样本推荐使用

BCA 法(货号: E-BC-K318-M), 植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法(货号: E-BC-K168-M)。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本中 α -半乳糖苷酶 (α -Gal) 酶活计算公式:

定义: 37 °C 条件下, 每克组织蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\alpha\text{-Gal 酶活 (U/gprot)} = (\Delta A_{405} - b) \div a \div T \times f \div C_{\text{pr}} \times 1000$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_{405} : 样本的绝对 OD 值 ($\Delta A_{405} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

T: 反应时间, 30 min

1000: 1 mmol/L=1000 $\mu\text{mol/L}$

附录1 关键数据

1. 技术参数

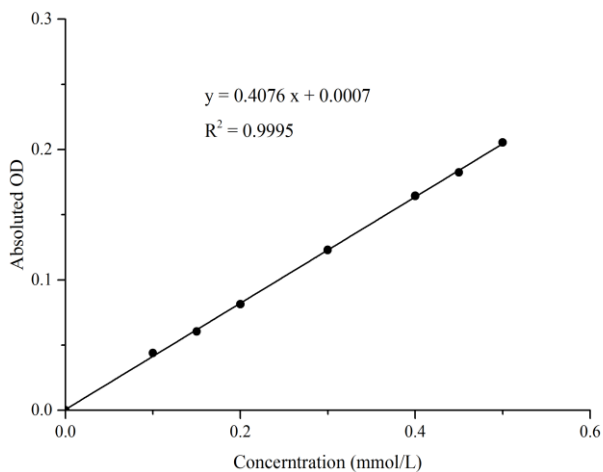
检测范围	0.02-29.06 U/L	批间差	4.0-8.0 %
灵敏度	0.02 U/L	批内差	1.0-3.0 %
回收率	98-100%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量10 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.1	0.15	0.2	0.3	0.4	0.45	0.5
OD 值	0.1	0.144	0.161	0.181	0.221	0.264	0.281	0.305
	0.1	0.143	0.159	0.181	0.224	0.264	0.283	0.305
平均 OD 值	0.1	0.144	0.160	0.181	0.223	0.264	0.282	0.305
绝对 OD 值	0	0.044	0.061	0.081	0.123	0.164	0.182	0.205

②绘制标曲(如下图)：



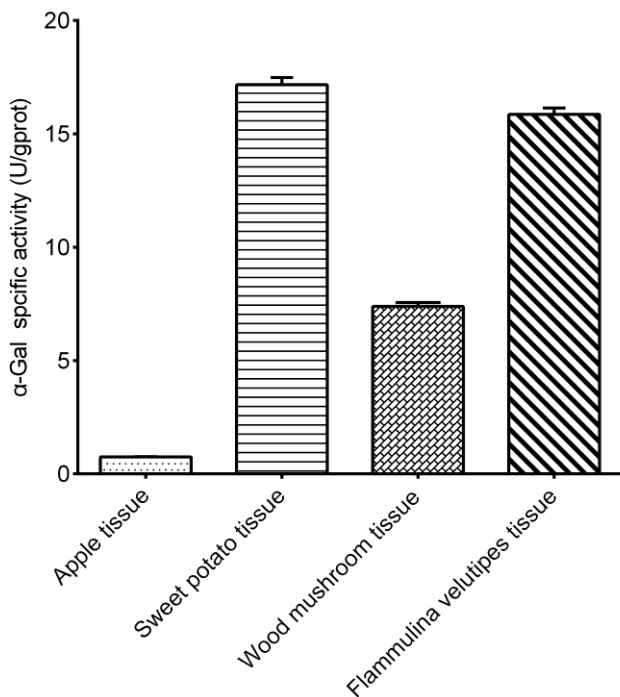
附录2 实例分析

例如检测苹果组织(数据仅供参考):

取10 μL 10%苹果组织上清液样本,按操作表操作,结果如下:标准曲线: $y = 0.4076x + 0.0007$,对照孔平均OD值为0.078,测定孔平均OD值为0.130, $\Delta A_{405} = 0.130 - 0.078 = 0.052$,测定出10%苹果组织匀浆的蛋白浓度为5.63 gprot/L计算结果为:

$$\alpha\text{-Gal酶活(U/gprot)} = (0.052 - 0.0007) \div 0.4076 \div 30 \div 5.630 \times 1000 = 0.75 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作,测定苹果组织(10%组织匀浆蛋白浓度5.63 gprot/L,加样量10 μL)、红薯组织(10%组织匀浆蛋白浓度3.60 gprot/L,加样量10 μL)、香菇组织(10%组织匀浆蛋白浓度3.98 gprot/L,加样量10 μL)、金针菇组织上清液(10%组织匀浆蛋白浓度2.23 gprot/L,加样量10 μL)中的 $\alpha\text{-Gal}$ 酶活(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。