

β-半乳糖苷酶 (β-Galactosidase, β-GAL) 试剂盒说明书

(分光法 24 样)

一、产品简介:

β-半乳糖苷酶 (β-GAL, EC 3.2.1.23) 又称 β-D-半乳糖苷半乳糖基转移酶, 简称乳糖酶, 专一性作用于 β-D-半乳糖苷类化合物的酶, 广泛用于生化分析、医学和食品等领域。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法, β-GAL 分解对-硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷生成对-硝基苯酚, 后者在 405nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率来计算 β-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°C保存 | |
| 试剂一 | 粉剂 mg×1 支 | 4°C保存 | 临用前加 2ml 水。 |
| 试剂二 | 液体 8mL×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:

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、β-半乳糖苷酶 (β-GAL) 活性测定:

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, 然后 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); 15000 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 可见分光光度计预热 30min 以上, 温度设定 37°C, 波长设定为 405nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

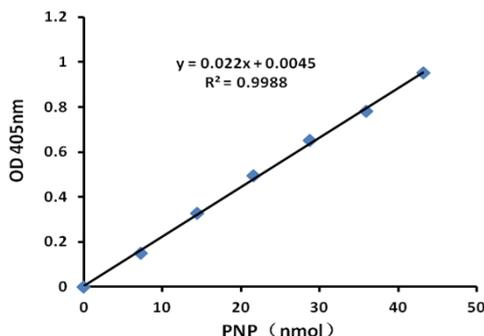
| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|--------------------------------|-----|-----|
| 样本 | 20 | 20 |
| 试剂一 | 75 | |
| 蒸馏水 | | 75 |
| 试剂二 | 115 | 115 |
| 迅速混匀, 37°C 保温 30min | | |
| 试剂三 | 540 | 540 |
| 混匀, 全部液体转移到 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) | | |

中，405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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 60 μ L，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：每毫克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。

β -GAL 活性(nmol/min/mg prot)=[$(\Delta A - 0.0045) \div 0.022$] \div (V1 \times Cpr) \div T = 75.76 \times ($\Delta A - 0.0045$) \div Cpr

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

β -GAL 活性(nmol/min/g 鲜重)=[$(\Delta A - 0.0045) \div 0.022$] \div (W \times V1 \div V) \div T = 75.76 \times ($\Delta A - 0.0045$) \div W

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。

β -GAL 活性(nmol/min/10⁴cell)=[$(\Delta A - 0.0045) \div 0.022$] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.152 \times ($\Delta A - 0.0045$)

5、按液体体积：

单位定义：每毫升液体每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

β -GAL 活性(nmol/min/mL)=[$(\Delta A - 0.0045) \div 0.022$] \div V1 \div T = 75.76 \times ($\Delta A - 0.0045$)

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

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；

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：20 μ L 标准品+75 μ L 蒸馏水+115 μ L 试剂二+540 μ L 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。