

β-半乳糖苷酶 (β-GAL) 活性检测试剂盒

(微量法)

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0448	β-半乳糖苷酶 (β-GAL) 活性检测试剂盒 (微量法)	100 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 100mL × 1 瓶	4℃
试剂一	粉剂 × 1 瓶: 临用前加入 2.5mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂仍-20℃保存。	-20℃
试剂二	液体 4mL × 1 瓶	4℃
试剂三	液体 13mL × 1 瓶	4℃

一、产品说明

β-半乳糖苷酶 (β-GAL) (EC 3.2.1.23)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中,能够催化β-半乳糖苷化合物中β-半乳糖苷键水解,此外还具有转半乳糖苷的作用。β-GAL 不仅可为植物的快速生长释放储存的能量,还能在正常的多糖代谢、细胞壁组分代谢以及衰老时细胞壁降解过程中催化多糖、糖蛋白以及半乳糖脂末端半乳糖残基的水解,释放自由的半乳糖。

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 400nm 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、自备材料

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。

三、样品准备

- 1、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℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、细胞/细菌: 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 (10⁴ 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℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 3、液体样本: 直接检测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 400nm, 蒸馏水调零。

2、在 EP 管或 96 孔板中依下表操作:

试剂名称 (μL)	测定光	对照管
试剂一	25	
蒸馏水		25
试剂二	35	35
样本	10	10
迅速混匀, 37°C 保温 30min.		
试剂三	130	130
充分混匀, 400nm 处测定吸光值 A, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。		

五、活性的计算

A. 使用 96 孔酶标板计算公式如下

标准条件下回归方程为 $y = 0.0039x - 0.0027$; x 为标准品浓度 (nmol/mL), y 为吸光值。

1、按照样本蛋白浓度计算:

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。

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

$$= 59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{Cpr}.$$

2、按照样本鲜重计算:

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。

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

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

3、按照细菌/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。

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

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

4、按照液体体积计算:

单位的定义: 每 mL 样本每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 59.83 \times (\Delta A + 0.0027).$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.07mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 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. 使用石英比色皿计算公式如下

标准条件下回归方程为 $y = 0.00585x - 0.0027$; x 为标准品浓度 (nmol/mL), y 为吸光值。

1、按照样本蛋白浓度计算:

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。

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

$$= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{Cpr}.$$

2、按照样本鲜重计算

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。

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

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

3、按照细菌/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。
 β -GAL 活性(nmol/min/10⁴ceLL)=[(ΔA +0.0027)÷0.00585×V 反总]÷(500×V 样÷V 样总)÷T
=0.08×(ΔA +0.0027)。

4、按照血清/血浆体积计算

单位的定义: 每 mL 样本每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。
 β -GAL 活性(nmol/min/mL)=[(ΔA +0.0027)÷0.00585×V 反总]÷V 样÷T=39.89×(ΔA +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。