

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

微量法 100管/48样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

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。

测定原理:

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。

组成:

产品名称	GMS033-100T/48S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂二: 液体	4ml	4°C
试剂三: 液体	13ml	4°C
说明书	一份	

试剂一: 粉剂×1 瓶, -20°C保存; 临用前加入 2.5ml 蒸馏水, 充分溶解备用; 用不完的试剂仍-20°C保存。

自备仪器和用品:

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。

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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。



2、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。

3、培养液等液体样本：直接检测

测定步骤：

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

2、样本测定（在 EP 管或 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μl)	测定管	对照管
试剂一	25	
蒸馏水		25
试剂二	35	35
样本	10	10
迅速混匀，放入 37℃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。

β-GAL 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.00585x - 0.0027$ ；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。

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

$$= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

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) 按细菌或细胞密度计算：

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。

$$\beta\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.08 \times (\Delta A + 0.0027)$$

(4) 按液体体积计算：

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。

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

$$= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027)$$

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；C_{pr}：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. 用 96 孔板测定的计算公式如下

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

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



(1) 按样本蛋白浓度计算:

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) 按细菌或细胞密度计算:

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 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。

