

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

分光光度法 50管/24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	50T/24S	Storage
提取液: 液体	50ml	4°C
试剂一: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂二: 液体	15ml	-20°C
试剂三: 液体	50ml	4°C
说明书	一份	

试剂一: 粉剂×1 瓶, -20°C保存; 临用前每瓶加入 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、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<sup>4</sup> 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°C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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μl)	测定管	对照管
试剂一	200	
蒸馏水		200
试剂二	250	250
样本	50	50

迅速混匀，放入 37°C 准确水浴 30min

试剂三	1000	1000
-----	------	------

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:

标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.00543x - 0.0027$ ；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力单位。

$\beta\text{-GAL 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$

$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(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力单位。

$\beta\text{-GAL 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$

(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力单位。

$\beta\text{-GAL 活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$= 0.123 \times (\Delta A + 0.0027)$

(4) 按液体体积计算:

单位的定义：每 ml 液体样本每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$\beta\text{-GAL 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{ml}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T$

$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027)$

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；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。