

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

(货号: G0524W 微板法 48 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 60mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 粉剂 mg×1 支 | 4°C保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 1.5mL 蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂二 | 液体 5mL×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:

酶标仪、96 孔板、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, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

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, 再 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); 再 12000 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 打开酶标仪, 温度设定 37°C, 波长设定为 405nm。

② 在 EP 管中依次加入:

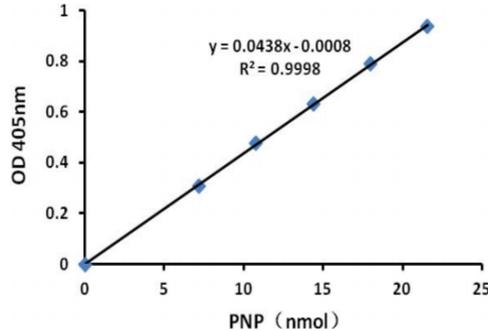
| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|--------------------------------------|-----|-----|
| 样本 | 10 | 10 |
| 试剂一 | 25 | |
| 蒸馏水 | | 25 |
| 试剂二 | 35 | 35 |
| 迅速混匀, 37°C保温 30min | | |
| 试剂三 | 180 | 180 |
| 混匀, 取 200μL 转移到 96 孔板中, 405nm 处测定吸光值 | | |

A, $\Delta A = A$ 测定 -A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。

【注】: 若 ΔA 小于 0.01, 可增加样本上样量 V1 (如增至 30 μ L, 则试剂三相应减少), 或延长孵育时间 T (如: 40min 或更长), 或增加取样质量 W; 则改变后的 V1 或 T 或 W 需重新代入计算公式计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0438x - 0.0008$: 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。

$$\beta\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0438] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D$$

$$= 76.1 \times (\Delta A + 0.0008) \div Cpr \times D$$

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。

$$\beta\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0438] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 76.1 \times (\Delta A + 0.0008) \div W \times D$$

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。

$$\beta\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0438] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 0.152 \times (\Delta A + 0.0008) \times D$$

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。

$$\beta\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0438] \div V1 \div T \times D = 76.1 \times (\Delta A + 0.0008) \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.01mL;

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;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

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 (2mg/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: 10 μ L 标准品+25 μ L 蒸馏水+35 μ L 试剂二+180 μ L 试剂三, 混匀, 取 200 μ L 至 96 孔板中, 于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。