

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0709

Size: 50T/24S

β-半乳糖苷酶 (β-GAL) 检测试剂盒说明书

分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置:

| 种类 | 试剂规格 | 储存条件 | 使用方法及注意事项 |
|-----|-------------|----------|---|
| 提取液 | 液体 50mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 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。 |
| 试剂二 | 液体 15mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂三 | 液体 50mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |

五、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°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。

六、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 (μ L) | 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。

七、 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。

$$\beta\text{-GAL 活力 (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\beta\text{-GAL 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ \div T = 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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。

$$\beta\text{-GAL 活力 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div \\ V_{\text{样总}}) \div T = 0.123 \times (\Delta A + 0.0027)$$

(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。

$$\beta\text{-GAL 活力 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T \\ = 61.39 \times (\Delta A + 0.0027)$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.5mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL; $V_{\text{样总}}$: 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: 细菌或细菌总数, 500 万; T : 反应时间, 30min。