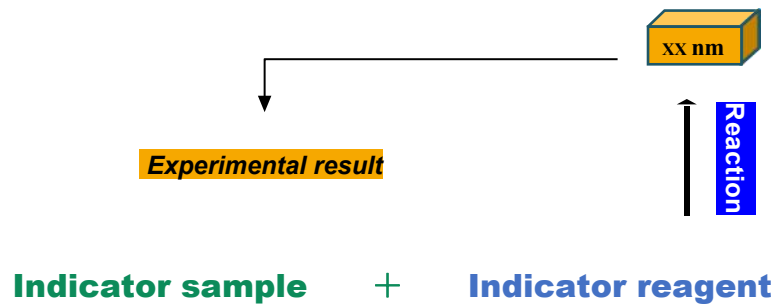


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

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

可见分光光度法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

产品内容：

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℃保存	-
试剂一	粉剂×1瓶	-20℃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℃保存。
试剂二	液体15mL×1瓶	4℃保存	-
试剂三	液体50mL×1瓶	4℃保存	-

产品说明：

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。

自备用品：

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。

操作步骤：

一、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（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。

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。

二、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。

三、β-GAL 活性计算:

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.32x - 0.0027$; 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 组织蛋白每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\beta\text{-GAL 活力 (nmol/h /mg prot)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.32 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 62.5 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

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 组织每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\beta\text{-GAL 活力 (nmol/h /g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.32 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 62.5 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(2) 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小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\beta\text{-GAL 活力 (nmol/h /10^4 cell)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.32 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.125 \times (\Delta A + 0.0027)$$

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 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; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; T: 反应时间, 0.5h。