

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。

自备仪器和样品：

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存。

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。

试剂二：液体4mL×1瓶，4°C保存。

试剂三：液体13mL×1瓶，4°C保存。

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

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

$$\begin{aligned} \beta\text{-GAL活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \beta\text{-GAL活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \beta\text{-GAL活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.08 \times (\Delta A + 0.0027) \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \beta\text{-GAL活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \end{aligned}$$

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。

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。

(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。

$$\beta\text{-GAL活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$=59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{pr}$$

(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。

β -GAL活性(nmol/min/g鲜重)=[$(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{反总}$] $\div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div T$

$$=59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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。

β -GAL活性(nmol/min/ 10^4 cell)=[$(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{反总}$] $\div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \div T$

$$=0.12 \times (\Delta A + 0.0027)$$

(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。

β -GAL活性(nmol/min/mL)=[$(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{反总}$] $\div V_{样} \div T$

$$=59.83 \times (\Delta A + 0.0027)$$

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。