

## **β -半乳糖苷酶(β-GAL)活性检测试剂盒说明书**

### **β -galactosidase Assay Kit**

**微量法**

货号： AK041

规格： 100T/48S

产品组成及保存条件：

	规格	储存条件
提取液 ES02	液体 100mL×1 瓶	4℃保存
AK041-A	粉剂×1 瓶	-20℃保存；临用前每瓶加入 2.5mL 蒸馏水，充分溶解备用；用不完的试剂需-20℃保存。
AK041-B	液体 4mL×1 瓶	4℃保存
AK041-C	液体 15mL×1 瓶	4℃保存
AK041-标准品 (5μmol/mL)	液体 1 mL×1 支	4℃保存

简介：

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。

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。

自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

粗酶液提取：

- 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 ES02 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 ES02)，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。
- 组织：按照组织质量(g)：提取液 ES02 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 ES02），进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

- 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。
- 制备标准品：用蒸馏水将标准液稀释至 250、125、62.5、31.25、15.625、0nmol/mL。
- 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	标准管
AK041-A	25		
蒸馏水		25	
AK041-B	35	35	
样本	10	10	

充分混匀，放入 37°C水浴 30 min			
标准液			70
AK041-C	130	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-GAL 活性计算:

1. 标准曲线的建立: 根据标准管的吸光度(x, 减去浓度为0的标准管OD值)和浓度(y, nmol/mL)

建立标准曲线, 将 $\Delta A$ 带入标准曲线中, 计算样本生成的产物量y (nmol/mL)。

2. β-GAL 活性计算:

(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。

$$\beta\text{-GAL活力}(U/mg\ prot) = (y \times V_{\text{反总}}) \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 14 \times y \div C_{\text{pr}}$$

蛋白浓度需要另外测定。

(2) 按样本质量计算:

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。

$$\beta\text{-GAL活力}(U/g\ 质量) = (y \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 14 \times y \div W$$

(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。

$$\beta\text{-GAL活力}(U/10^4\ cell) = (y \times V_{\text{反总}}) \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 0.028 \times y$$

C<sub>pr</sub>: 样本蛋白质浓度, mg/mL, 蛋白浓度需要另外测定; V<sub>反总</sub>: 反应体系总体积, 0.07mL;

V<sub>样</sub>: 加入反应体系中样本体积, 0.01mL; V<sub>总</sub>: 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。

#### 注意事项:

提取液中含有使蛋白变性的成分, 故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。