

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 (5umol/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:

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 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。
2. 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:

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. 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。
3. 样本测定(在 EP 管或 96 孔板中依次加入下列试剂):

试剂名称(ul)	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℃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 ΔA 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。

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

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。

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

（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。

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

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，蛋白浓度需要另外测定；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；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。