

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

分光光度法 50 管/24 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。

试剂组成和配制:

提取液:液体 50mL \times 1 瓶,4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂一:粉剂 \times 1 瓶,-20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 保存。

试剂二:液体 15mL \times 1 瓶,4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂三:液体 50mL \times 1 瓶,4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

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。

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

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。

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

(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力单位。

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

(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。

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

$V_{\text{反总}}$: 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; 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。