

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℃ 保存。

试剂一:粉剂×1 瓶,-20℃ 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℃ 保存。

试剂二:液体 4mL×1 瓶,4℃ 保存。

试剂三:液体 13mL×1 瓶,4℃ 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℃ 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。

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℃ 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-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。

$$\beta\text{-GAL 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[(\Delta A+0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T$$

$$=39.89 \times (\Delta A+0.0027) \div Cpr$$

(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。

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

$$=39.89 \times (\Delta A+0.0027) \div W$$

(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。

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

$$=0.08 \times (\Delta A+0.0027)$$

(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。

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

$$=39.89 \times (\Delta A+0.0027)$$

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。

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

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

(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。

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

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

(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。

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

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

(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。

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

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

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。