

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

(货号: ADS-F-TDX016 分光法 24 样)

### 一、产品简介:

β-半乳糖苷酶 (β-GAL, EC 3.2.1.23) 又称β-D-半乳糖苷半乳糖基转移酶, 简称乳糖酶, 专一性作用于β-D-半乳糖苷类化合物的酶, 广泛用于生化分析、医学和食品等领域。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法, 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 405nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率来计算β-GAL 活性。

### 二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 支	4°C保存	临用前加 2ml 水。
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液 20mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

### 四、β-半乳糖苷酶 (β-GAL) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

- ① 组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 再 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清作为粗体液, 置于冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取

- ② 细菌或细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 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); 再 12000 rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量( $10^4$  个): 提取液体积 (mL)为 500~1000:1 比例进行提取。

- ③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

#### 2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上, 温度设定 37°C, 波长设定为 405nm, 蒸馏水调零。

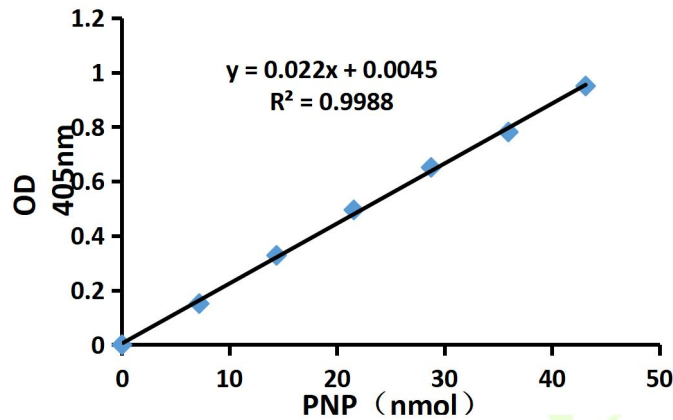
- ② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	75	
蒸馏水		75
试剂二	115	115
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	540	540
混匀, 全部液体转移到 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 405nm 处测定吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定管需设一个对照管)。		

【注】：若 $\Delta A$  过小，可增加样本上样量  $V_1$ （如增至  $60\mu\text{L}$ ，则试剂三相应减少），或延长保温时间（如： $40\text{min}$  或更长），则改变后的  $V_1$  或  $T$  需重新代入计算公式计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.022x + 0.0045$ ：  $x$  是标准品 PNP 的质量（ $\text{nmol}$ ），  $y$  是 $\Delta A$ 。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟产生  $1\text{nmol}$  对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$\beta\text{-GAL}$  活性( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )= $[(\Delta A - 0.0045) \div 0.022] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \times D = 75.76 \times (\Delta A - 0.0045) \div \text{Cpr} \times D$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟产生  $1\text{nmol}$  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)= $[(\Delta A - 0.0045) \div 0.022] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D$   
= $75.76 \times (\Delta A - 0.0045) \div W \times D$

4、按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生  $1\text{nmol}$  对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$\beta\text{-GAL}$  活性( $\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}$ )= $[(\Delta A - 0.0045) \div 0.022] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D$   
= $0.152 \times (\Delta A - 0.0045) \times D$

5、按液体体积：

单位定义：每毫升液体每分钟产生  $1\text{nmol}$  对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$\beta\text{-GAL}$  活性( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$ )= $[(\Delta A - 0.0045) \div 0.022] \div V_1 \div T \times D = 75.76 \times (\Delta A - 0.0045) \times D$

$V$ ---加入提取液体积，  $1\text{mL}$ ；  $V_1$ ---加入反应体系中样本体积，  $0.02\text{mL}$ ；

$W$ ---样本质量，  $\text{g}$ ；  $T$ ---反应时间，  $30\text{min}$ ；

PNP 对分子质量--- $139.11$ ；  $500$ ---细胞或细菌数量， 万；

$D$ ---稀释倍数， 未稀释即为  $1$ ；

$\text{Cpr}$ ---样本蛋白质浓度，  $\text{mg}/\text{mL}$ ， 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 ( $1\text{mg}/\text{mL}$ )：向标准品 EP 管里面加入  $1\text{ml}$  蒸馏水。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品： $0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3\text{mg}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入： $20\mu\text{L}$  标准品+ $75\mu\text{L}$  蒸馏水+ $115\mu\text{L}$  试剂二+ $540\mu\text{L}$  试剂三，混匀，全部液体转移到  $1\text{mL}$  玻璃比色皿中，于  $405\text{nm}$  下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。