

## 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<sup>4</sup>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。

$$\beta\text{-GAL 活性(nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\beta\text{-GAL 活性(nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 39.89 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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。

$$\beta\text{-GAL 活性(nmol/min/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 0.08 \times (\Delta A + 0.0027)$$

(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。

$$\beta\text{-GAL 活性(nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T \\ = 39.89 \times (\Delta A + 0.0027)$$

$V$  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;  $C_{\text{pr}}$ : 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。

$$\beta\text{-GAL 活性(nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\beta\text{-GAL 活性(nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 59.83 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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。

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

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

(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。

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

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

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 0.07mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入反应体系中样本体积, 0.01mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $C_{\text{pr}}$ : 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。