

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

(货号: BP10304F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

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:

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度   | 注意事项                                                          |
|------|-------------|--------|---------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                               |
| 试剂一  | 粉剂 1 支      | 4℃避光保存 | 1. 临用前加 2ml 水;<br>2. 保存周期与试剂盒有效期相同。                           |
| 试剂二  | 液体 8mL×1 瓶  | 4℃保存   |                                                               |
| 试剂三  | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                               |
| 标准品  | 粉剂 1 支      | 4℃避光保存 | 1. 若重新做标曲, 则用到该试剂;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>3. 溶解后的标品一周内用完。 |

### 三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

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℃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 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 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℃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。

#### 2、检测步骤:

① 分光光度计预热 30min 以上 (等仪器过自检程序亦可), 温度设定 37℃, 波长设定为 405nm, 蒸馏水调零。

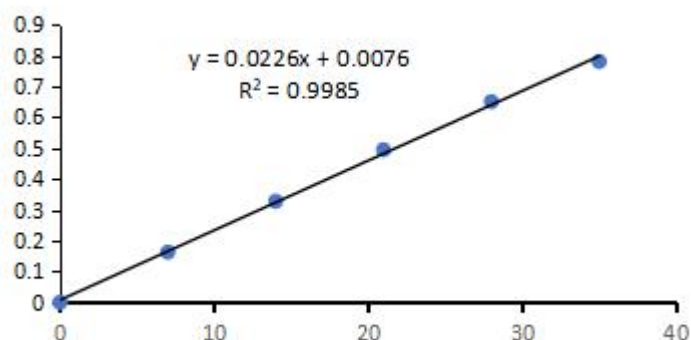
② 在 EP 管中依次加入:

| 试剂组分 (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 60μL, 则试剂三相应减少), 或延长保温时间 (如: 40min 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:  $y = 0.0226x + 0.0076$ :  $x$  是标准品 PNP 的质量 (nmol),  $y$  是  $\Delta A$ 。



2、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-GAL 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0076) \div 0.0226] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D$$

$$= 73.75 \times (\Delta A - 0.0076) \div W \times D$$

3、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 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-GAL 活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0076) \div 0.0226] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \times D = 73.75 \times (\Delta A - 0.0076) \div C_{\text{pr}} \times D$$

4、按液体体积:

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

$$\beta\text{-GAL 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A - 0.0076) \div 0.0226] \div V_1 \div T \times D = 73.75 \times (\Delta A - 0.0076) \times D$$

5、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 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-GAL 活性}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A - 0.0076) \div 0.0226] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D$$

$$= 0.1475 \times (\Delta A - 0.0076) \times D$$

$V$ ---加入提取液体积, 1mL;

$V_1$ ---加入反应体系中样本体积, 0.02mL;

$W$ ---样本质量, g;

$T$ ---反应时间, 30min;

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;  
Cpr---样本蛋白质浓度, mg/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 标曲为非必做实验, 用户可根据实验需求制作标曲, 亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液 (1mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水;
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下:

| 标品浓度<br>mg/mL | 0   | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 |
|---------------|-----|-----|------|-----|------|-----|
| 标品母液 uL       | 0   | 20  | 30   | 40  | 50   | 60  |
| 蒸馏水 uL        | 200 | 180 | 170  | 160 | 150  | 140 |
| 各标准管混匀待用。     |     |     |      |     |      |     |

- 5 依据测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。  
在 EP 管中依次加入:

| 试剂组分 (μL)                                                                              | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 标品                                                                                     | 20  |              |
| 蒸馏水                                                                                    | 75  | 95           |
| 试剂二                                                                                    | 115 | 115          |
| 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, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。 |     |              |