

β-半乳糖苷酶 (β-GAL) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10469

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 80 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂一: 临用前每瓶加入 5mL 双蒸水, 充分溶解备用; 用不完的试剂仍-20°C保存。
- 2、标准品: 5μmol/mL 的对硝基苯酚溶液。

产品说明:

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。

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。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

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/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

- 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 (10⁴ 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°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°C离心10min, 取上清, 置冰上待测。

二、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、标准液的处理：用蒸馏水将标准液稀释至200、100、50、25、12.5、6.25、0nmol/mL。

3、样本测定（在EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管	标准管
试剂一	200		
蒸馏水		200	
试剂二	250	250	
样本	50	50	
迅速混匀，放入37°C准确水浴30min			
标准液			500
试剂三	1000	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。

三、 β -GAL活性计算

1、标准曲线的建立：

根据标准管的吸光度（x，减去浓度为0的标准管OD值）和浓度（y，nmol/mL）建立标准曲线，将 ΔA 带入标准曲线中，计算样本生成的产物量y（nmol/mL）。

2、 β -GAL活性计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg 组织蛋白每小时产生1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\beta\text{-GAL活力(U/mg prot)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 20 \times y \div C_{\text{pr}}$$

蛋白浓度需要另外测定。

（2）按样本质量计算：

单位的定义：每g 组织每小时产生1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\beta\text{-GAL活力(U/g 质量)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 20 \times y \div W$$

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每1 万个细菌或细胞每小时产生1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\beta\text{-GAL活力(U}/10^4 \text{ cell)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.04 \times y$$

Cpr: 样本蛋白质浓度，mg/mL；V 反总: 反应体系总体积，0.5mL；V样: 加入反应体系中样本体积，0.05mL；V样总: 加入提取液体积，1mL；W: 样本质量，g；500: 细胞或细菌总数，500 万；T: 反应时间，0.5h。

相关发表文献：

[1] Shuang Li, Junkun Zhan, Yanjiao Wang, et al. Exosomes from hyperglycemia-stimulated vascular endothelial cells contain versican that regulate calcification/senescence in vascular smooth muscle cells. Cell & Bioscience. September 2018;(IF3.405)

[2] Dongjie Jia, Fei Shen, Yi Wang, et al. Apple fruit acidity is genetically diversified by natural variations in three hierarchical epistatic genes: MdSAUR37, MdPPP2CH and MdALMTII. Plant Journal. May 2018;(IF5.726)