上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：400-666-5481　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：3008007435@qq.com

β-半乳糖苷酶 酶活检测方法

测定条件为以 oNPG（o-nitropheny-D-galactopyranoside）为底物，37℃,PH4.5 时水解 15min。

试剂：

1. 乙酸溶液（2.0mol/L）：用移液管准确量取 57.5 的冰乙酸用水稀释，定容至 500ml，混匀，存储于冰箱。

2. 氢氧化钠溶液（4.0mol/L）：称取 40g 氢氧化钠溶于足够的水中，定容至 250ml，混匀。

3. pH4.5 HAc-NaOH 缓冲液：分别准确量取 50ml 的2.0mol/L 的乙酸溶液和 11.3ml 的 4.0mol/L 的氢氧化钠溶液于 800ml 的去离子水中，充分搅拌。用 PH 计测定校检，必要时用冰乙酸或 4.0mol/L 的氢氧化钠溶液调节，使pH 在 4.5±0.05，定容至 1000 ml。

4. 碳酸钠溶液（1%）：称取 1g 无水碳酸钠，溶于适量的水中，定容至 100ml。

5. 碳酸钠溶液（10%）：称取 10g 无水碳酸钠，溶于适量的水中，定容至 100ml。

6. oNP 母液（2.0mmol/L）：将 139.0mg 的 oNP 置于500ml 的容量瓶中，用 10ml 的 95%的乙醇漩涡溶解，再用 1%的碳酸钠溶液稀释至刻度。

7. oNP 标准溶液

（1）0.1mmol 标准溶液：吸取 2.0mmol 的 oNP 母液5.0ml，置于 100ml 的容量瓶中，用 1%的碳酸钠溶液稀释至刻度。

（2）0.14mmol 标准溶液：吸取 2.0mmol 的 oNP 母液7.0ml，置于 100ml 的容量瓶中，用 1%的碳酸钠溶液稀释至刻度。

（2）0.18mmol 标准溶液：吸取 2.0mmol 的 oNP 母液9.0ml，置于 100ml 的容量瓶中，用 1%的碳酸钠溶液稀释至刻度。

8.底物溶液：将 370.0mg 的 oNPG 加入到 100ml 的试剂瓶中，加入50ml 的 pH4.5 HAc-NaOH 缓冲液，漩涡搅拌使之溶解，然后用此缓冲液稀释，定容至 100ml。（注意：新鲜配制的oNPG 为无色透明，但其在自然状态下会缓慢发生降解，一次底物制备应尽快用完。一般情况下在 4℃冷藏可存放 2-3 天，发现溶液变黄时应及时丢弃，从新配制。）

仪器：

PH 计，移液枪，电热恒温水浴锅，分光光度计

分析步骤：

1. 标准消光系数：分光光度计 420nm 下，用光程为 1cm 的比色皿中测定三个 oNP 标准液的吸光值。用水对仪器调零。通过如下公式计算每个 oNP 的标准液（0.10mmol,0.14mmol,0.18mmol）消光系数 M。

Є=An/C

其中 An 是每个 oNP 标准液在 420nm 是的吸光值，C 是每个oNP 标准液相应浓度。对于每个标准液 M 值要近似为 4.60M.各自的 oNP 的浓度（0.10M,0.14M,0.18M）所读出的三个 oNP标准液的吸光值作线性回归分析，相关系数 R2不能小于 0.99。

三个 oNP 标准液的 M 平均值用于下面酶活计算。

2. 测定程序：

（1）取 1ml 待测原酶液，称重，记录数据。

（2）用水将所取的 1ml 的原酶液稀释到所需倍数（3）对每一个样品要有三个平行和一个空白，吸取 2ml 的底物溶液加入到 25*150 的试管中，在 37℃±0.1℃电热恒温水浴锅中水浴平衡 10min。

（4）在零时刻时，间隔一定的时间，迅速吸取 0.5ml 的稀释酶液加入到已经温度平衡的底物中，空白对照中加入 0.5ml 的水，通过短暂的涡旋（1s）混合，然后立即重新放入水浴锅中反应。

（5）经过严格的 15min 反应后，间隔与上次加酶液时相同的时间，在所有管中迅速加入 2.5ml 的 10%碳酸钠溶液，迅速混匀，使反应终止。

（6）在样品和空白管中加入 20ml 的水使其稀释至 25ml，然后彻底混匀。

（7）分光光度计用水对仪器调零，在光程 1cm 的比色皿中测定样品各管和空白在 420nm 时的吸光值。记录数据。

分析结果：

乳糖酶活力（每克样品中的乳糖酶活力）计算公式如下：

ALU/g=［（As-B）×25］/［Ɛ×15×W］

其中：

As:测试液吸光率的平均值；B:空白液吸光率的平均值；

25：稀释后反应混合液的终体积，毫升；

Ɛ：每μmoloNP 标准液的吸光率的平均值；

15：反应时间，min;

W:在反应时用到的 0.5ml 的测试准备液中所含有的原始酶液的重量，g。（W=m 原酶液×0.5÷1÷稀释倍数）

允许误差：在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差不得超过算数平均值的 5%。

注意事项：

1. 底物溶液现配现用，配制时一定要迅速，避光，否则底物溶液容易见光分解，变黄。不能继续使用。

2. 样品稀释的倍数要准确，确保稀释液的读数在 0.2-0.8 之间，如果不在此范围内应重新稀释检测。

3. 对每一个样品应进行多人多次测量，取平均值。