上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

β-半乳糖苷酶(β-GAL)活性检测试剂盒(微量法)

货号： R41761

规格： 100T

有效期：6个月

产品组成及保存条件：

	规格	储存条件
提取液ES02	液体100mL×1瓶	2-8℃保存
R41761-A	粉剂×1瓶	-20℃保存；临用前每瓶加入2.5mL蒸馏水， 充分溶解备用；用不完的试剂需-20℃保存。
R41761-B	液体4mL×1瓶	2-8℃保存
R41761-C	液体15mL×1瓶	2-8℃保存
R41761-标准品(5μmol/mL)	液体1mL×1支	2-8℃保存

简介

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。

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、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

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（10^4 个）：提取液 ES02 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 ES02），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）；15000g4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2. 组织：按照组织质量（g）：提取液 ES02 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 ES02），进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

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. 制备标准品：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 管或 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称(ul)	测定管	对照管	标准管
R41761-A	25		
蒸馏水		25	
R41761-B	35	35	
样本	10	10	
充分混匀，放入37℃水浴30 min			
标准液			70
R41761-C	130	130	130

充分混匀，400nm 处测定吸光值A，计算ΔA=A 测定-A 对照；每个测定管需设一个对照管

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。

β-GAL 活力(U/mg prot)=(y×V 反总)÷(V 样×Cpr)÷T=14×y÷Cpr

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。

β-GAL 活力(U/g 质量)＝(y×V 反总)÷(W×V 样÷V 样总)÷T=14×y÷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。

β-GAL 活力(U/10^4 cell)= (y×V 反总)÷(500×V 样÷V 样总)÷T=0.028×y

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；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；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万；T：反应时间，0.5h。