

β -半乳糖苷酶 (β -GAL) 活性检测试剂盒 (可见分光光度法)

产品货号: BA1029

产品规格: 50管/24样

产品内容:

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

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℃保存。
2. 标准品: 5 μ mol/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、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 (10^4 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。

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):



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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, 计算样品生成的产物量 (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。

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

蛋白浓度需要另外测定。

(2) 按样本鲜重计算:

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。

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

(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。

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

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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com