

β-半乳糖苷酶活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYFA1-M48	β-半乳糖苷酶活性检测试剂盒	48T	微量法
AYFA1-M96		96T	

一、测定意义：

β-半乳糖苷酶水解乳糖中的 β-1, 4-D半乳糖苷键，使其降解成为半乳糖和葡萄糖，同时具有半乳糖苷的转移作用。

二、测定原理：

以对硝基苯-β-D-半乳糖苷为底物，水解生成对硝基酚，产物显黄色，在 400nm 有特征吸收峰。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 12mL×1 瓶	液体 24mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
	试剂二配制：用时每瓶粉剂加入试剂一 6mL，混匀充分溶解。		
试剂三	液体 12mL×1 瓶	液体 24mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品 (1mg/mL)	液体 1mL×1 支	液体 1mL×2 支	2-8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

1、组织：按照组织质量（g）:提取液(mL)为 1:10 的比例（建议称取0.1 g 组织，加入 1 mL提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。

2、细菌、细胞：按照细胞数量 10^4 个：提取液体积（mL）500~1000:1 的比例（建议500万细胞加入1 mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3s，间隔 s，总时间3 min），5000 rpm，4℃离心10min，取上清置冰上待测。

3、血清（浆）等液体：直接测定。

测定步骤

1. 酶标仪预热30min 以上，调节波长至400nm。
2. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 将1mg/mL标准品用蒸馏水依次稀释至0、3.125、6.25、12.5、25、50、100μg/mL

标准液备用；

4. 操作表（96孔酶标板中）：

试剂名称	测定管	对照管	空白管	标准管
样品（ μL ）	10	10	-	-
蒸馏水（ μL ）	-	-	10	-
不同浓度标准液（ μL ）	-	-	-	10
试剂一（ μL ）	100	100	100	100
试剂二（ μL ）	20	-	20	20
混匀，37℃孵育 15min。				
试剂三（ μL ）	100	100	100	100
试剂二（ μL ）	-	20	-	-
混匀，静置 3min，于波长 400nm 测定各管吸光度，分别记为 A 测定管、A 对照管、A 空白管、A 标准管， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。				

五、 β -半乳糖苷酶活性计算：

1、标准曲线绘制：

以吸光度值为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线 $y = kx + b$ ， x 为吸光度值， y 为标准品浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入公式计算出样本浓度（ y ， $\mu\text{g/mL}$ ）；

2、血清样本 β -半乳糖苷酶计算：

单位定义：每毫升血清每分钟催化产生 1 μg 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式： β -半乳糖苷酶（U/mL）= $y \div T$

3、组织、细胞样本 β -半乳糖苷酶计算：

(1)按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 μg 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式： β -半乳糖苷酶（U/mg prot）= $y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$

(2)按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟催化产生 1 μg 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式： β -半乳糖苷酶（U/g）= $y \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

(3)按照细菌或细胞数量计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 μg 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式： β -半乳糖苷酶 (U/10⁴ cell) = $y \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01mL;

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL;

T: 反应时间, 15min;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

500: 细胞/细菌数, 500 万;

六、 注意事项:

- 1、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;
- 2、试剂二需要密封避光保存。