



β-半乳糖苷酶(β-GAL)检测试剂盒 (ONPG 法) 使用说明书

产品编号: YK3030-50T

储存条件: -20°C保存。

产品组成:

组分名称	规格	保存条件
A 液 (提取液)	10 mL	室温
玻璃珠 (425-600 μm, Acid washed)	5 g	室温
ONPG (4 mg/mL)	1.7 mL×6	-20°C
B 液 (缓冲液)	30 mL	-20°C
C 液 (终止液)	75 mL	室温
说明书	1 份	

注: 实验前请仔细阅读说明书

产品简介:

β-半乳糖苷酶 (β-GAL) 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, 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, 还可以多糖代谢、细胞壁组分代谢过程中催化多糖、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, 在食品工业、生物技术和医药等领域发挥着重要作用。

LacZ 是常用的报告基因, 作为转染的参照体系。其蛋白产物 β-半乳糖苷酶(β-galactosidase)性质稳定, 活性容易测定。

本试剂盒采用经典的 ONPG (o-nitro-phenyl-β-D-galactopyranoside)底物成色法,利用 β-GAL 催化无色的 ONPG 转变成黄色产物的原理,通过对样品 405-430 nm 范围波长下的吸光度的测定,可获得 β-GAL 的相对活性。该方法操作简单、结果稳定。

注意事项:

需自备 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、去离子水。



操作步骤:

一、样品准备

1. 细菌/细胞样本准备: 收集 1-2 mL ($>10^7$ 个) 细菌或细胞到离心管内, 12,000 rpm, 4 °C 离心 5 min, 弃上清收集细胞沉淀。
2. 组织样本准备: 将组织液氮研磨成粉末状, 称取约 20-60 mg 粉末置于冰上待用。
3. 液体样本准备: 澄清的液体直接检测; 若浑浊则离心后取上清检测。

二、蛋白提取

1. 用 100 μ L 预冷 A 液 (提取液) 悬浮沉淀, 并快速转移到 1.5 mL 离心管中。
2. 加入 0.05 g 的玻璃珠, 在旋涡振荡器上剧烈震荡混合 5-10 min (间歇冰浴冷却)。
3. 用移液器或者巴斯德吸管回收提取液。
4. 再加入 100 μ L 预冷 A 液 (提取液) 到剩余的玻璃珠中, 稍加震荡, 再次回收提取液。
5. 合并两次所得提取液即为总蛋白样品。
6. 12,000 rpm, 4 °C 离心 15 min, 取上清。提取总蛋白样品直接用于后续活性检测实验或 -80 °C 保存备用。
7. 利用自备的 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

三、样品测定

1. 酶标仪/分光光度计预热 30 min 以上, 温度设定 37°C, 调节波长至 420 nm, 空白组调零。
2. 在离心管中依次加入:

	测定组	对照组	空白组
总蛋白	30 μ L	30 μ L	
ONPG	70 μ L		70 μ L
去离子水		70 μ L	30 μ L
B 液 (缓冲液)	200 μ L	200 μ L	200 μ L
测定至少三种不同体积的裂解液(即 10、20 和 30 μ L)。吸光度的变化应与测定的裂解液量成线性关系。如果不是, 将无法得到准确的测定结果。混匀后 37°C 静置 30 min			
C 液 (终止液)	500 μ L	500 μ L	500 μ L
混匀后, 置于 420 nm 波长的酶标仪/分光光度计中测量吸光值 A, $\Delta A = A(\text{测定}) - A(\text{对照})$ (每个测定管需设一个对照管)。			



注：若 ΔA 过小，可以延长保温时间（如：40 min 或更长），或增加样本上样量 V1（如增至 30 μL ，则去离子水相应减少），则改变后的 T 或 V1 需重新代入计算公式计算。

四、活性计算

1. 无标准品蛋白活性计算方法：

$$\text{活性} = \text{nmoles of ONPG hydrolyzed/t/mg protein}$$

$$\text{nmoles of ONPG hydrolyzed} = \frac{(\text{OD}_{420}) (8 \times 10^5 \text{ nanoliters})}{(4500 \text{ nl/nmoles-cm})(1 \text{ cm})}$$

说明：where 4500 is the extinction coefficient

t = the time of incubation in minutes at 37°C (i.e. 30 minutes)

and mg protein is the amount of protein assayed

2. 自备标准品蛋白活性计算方法：

1) 建立标准浓度 ONP 标准曲线方程；

2) 将检测吸光值代入标准曲线方程，得到 ONP 浓度；

3) 酶活定义：每毫克蛋白每分钟水解 1 nmol ONPG 产生 ONP 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GAL 活性 (nmol/min/mg protein)} = \text{ONP 物质的量} \div (\text{V} \times \text{Cpr}) \div \text{T}$$

V----加入蛋白体积 Cpr---蛋白浓度 T----反应时间

20240314 版