



## β-半乳糖苷酶检测试剂盒

### (β-gal Assay Kit)

#### 产品说明:

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。本试剂盒提供经典的ONPG底物成色法，β-半乳糖苷酶催化无色的ONPG (*o*-nitro-phenyl-β-D-galactopyranoside)转变成黄色产物，通过测定OD值，可获得β-半乳糖苷酶的相对活性。使用通用裂解缓冲液，能与其他类型的报告基因检测和蛋白含量检测兼容。

#### 产品内容与储存方法:

名称	数量	保存条件
5x Universal Lysis Buffer (通用裂解液)	25 ml	-20℃
ONPG Substrate Solution (底物溶液)	30 ml	4℃

试剂盒可作300次微量法β-半乳糖苷酶检测，100次标准测定法检测。低温运输。底物溶液4℃避光保存，5x ULB于-20℃保存。有效期6个月。

#### 所需其它试剂:

使用者需准备PBS、双蒸水等。如用标准测定法，需配制1M 碳酸钠作为反应终止液。

#### 操作方法:

##### 裂解细胞:

- 1) 新鲜配制裂解液: 临用前，取适量5xUniversal Lysis Buffer (ULB)，用双蒸水稀释至1xULB，混匀。1xULB可在4℃存放，以后使用。
- 2) 细胞清洗: 倾去培养板/皿中的培养液，加入足量PBS，轻轻洗涤细胞。完全倾去洗涤液。
- 3) 细胞裂解: 推荐按照表中的体积，在孔/皿中加入1xULB，混匀。培养板可在微型振荡器上震荡5~10 min; 培养皿可直接用细胞刮刀刮下细胞，将细胞悬液移入1.5 ml离心管，在涡旋振荡器上充分混悬震荡30秒。裂解细胞悬液可直接用于显色反应，也可离心1 min，取上清做显色反应。

##### 微量测定法:

- 1) 96孔板各孔中加入10~50 μl待测细胞裂解样品，以1xULB和非转染细胞做两种空白对照。每孔加入100 μl底物溶液。于室温或37℃放置5 min到数小时。
- 2) 待反应液出现黄色，在酶标仪上测定410nm波长（或405~430nm波长）下的吸光度。
- 3) 微量测定时不需加入终止液。

##### 标准测定法:

- 1) 标记一系列Eppendorf管，每管中加入50~100 μl待测样品，以1xULB和非转染细胞做两种空白对照。每管加入300 μl底物溶液。于室温或37℃水浴放置5 min到数小时。
- 2) 待反应液出现黄色，同时向各管中加入500 μl反应终止液。

- 3) 在分光光度计上测定410nm波长（或405~430nm波长）下的吸光度。

**注意事项:**

- 1) 依转染效率的不同，反应液出现明显黄色可能仅需10 min，数小时甚至过夜。对反应过快者，可用PBS适当稀释细胞裂解样品，再做测定。如细胞转染效率较低，可适当减少细胞裂解时1xULB用量，增加测定时裂解样品体积。
- 2)  $\beta$ -半乳糖苷酶活性与ONPG呈色密度的相关线性范围较窄，所以反应液出现黄色后，继续反应时间不要太长。
- 3) 测定时，尽量避免反应液出现气泡。
- 4) 如要准确定量测定 $\beta$ -半乳糖苷酶活性，需要通过同时测定 $\beta$ -半乳糖苷酶标准品的系列吸光度，绘制标准曲线，以计算样品的酶活性。

**表：不同容器细胞所需1xULB的体积。**

96孔板	48孔板	24孔板	12孔板	6孔板	35 mm平皿	60 mm平皿
50 $\mu$ l	80 $\mu$ l	150 $\mu$ l	250 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1000 $\mu$ l