

β-葡萄糖苷酶 (β-GC) 检测试剂盒

微量法

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

货号：BC2565

规格：100T/48S

产品内容：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：粉剂×1瓶，-20℃保存；临用前每瓶加入12mL双蒸水，充分溶解备用；用不完的试剂仍-20℃保存。

试剂二：液体15mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：液体15mL×1瓶，4℃保存。

标准品：液体1ml×1支，取1.5ml EP管加入1ml，5μmol/ml的对硝基苯酚溶液。

产品说明：

β-GC (EC 3.2.1.21) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，催化β-糖苷键水解，具有多方面生理作用：在纤维素的糖化作用中，β-GC负责进一步水解纤维素二糖和纤维素寡糖生成葡萄糖；β-GC水解萜烯类香气前驱体，使糖苷键合态变成游离态。从而产生香味；β-GC能够水解植物体内野黑樱苷，释放HCN，从而防止昆虫取食。

β-GC分解对-硝基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷生成对-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-GC活性。

试验中所需的仪器和试剂：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水

操作步骤：

一、粗酶液提取：

1、细菌或培养细胞的处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每500万细菌或细胞加入1mL提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率20%，超声3s，间隔10s，重复30次），15000g，4℃，离心20min，取上清，置冰上待测。

2、组织的处理：称取约0.2g组织，加入1mL提取液进行冰浴匀浆；15000g，4℃，离心20min，取上清，置冰上待测。

3、标准样品的准备：取100μL标准液，加入到400μL试剂三中，得到1μmol/ml标准液，十倍稀释到100nmol/ml，倍比稀释：50、25、12.5、6.25nmol/ml，稀释液用试剂二。100、50、25、12.5、6.25nmol/ml做标准液。

二、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. 加样表

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管
试剂一	120		
试剂二	150	150	
样本	30	30	

充分混匀，放入37℃准确水浴30min后，立即放入沸水浴中煮沸5min（盖紧，以防止水分散失），流水冷却后充分混匀（以保证浓度不变）

试剂一		120	
上清液	70	70	
标准液			70
试剂三	130	130	130

充分混匀，8000g，4℃，离心5min，取上清液（在EP管或96孔板中加入下列试剂）

充分混匀，室温静置2min后，400nm处测定吸光值A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

β-GC活力计算：

1、标准曲线建立：根据标准管的浓度（x）和吸光度（减去浓度为0标准管的OD值，y），建立标准曲线。

2、根据标准曲线，将 ΔA （y）带入公式计算样品产物浓度x（nmol/ml）。

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白在每ml每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$\beta\text{-GC活力(U/mg prot)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 20x \div C_{\text{pr}}$

需要另外测定，建议使用本公司BCA蛋白质含量测定试剂盒。

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织在每ml每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$\beta\text{-GC活力(U/g鲜重)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 20x \div W$

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每1万个细菌或细胞在每ml每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$\beta\text{-GC活力(U}/10^4 \text{ cell)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (1000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.02x$

Cpr: 样本蛋白质浓度，mg/ml；V反总：反应体系总体积，0.3ml；V样：加入反应体系中样本体积，0.03ml；V样总：加入提取液体积，1ml；W：样品质量，g；1000：细胞或细菌总数，1000万；T：反应时间，0.5h。