

β-葡萄糖苷酶(β-GC)活性检测试剂盒说明书

β-glucosidase Assay Kit

微量法

货号: AK045

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

货号	规格	储存条件
提取液 ES02	100mL×1 瓶	4℃保存
AK045-A	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前每瓶加入12mL 蒸馏水, 充分溶解备用; 剩余试剂需-20℃保存 4 周, 避免反复冻融。
AK045-B	15mL×1 瓶	4℃保存
AK045-C	15mL×1 瓶	4℃保存
AK045-标准品 (5 μmol/mL)	1mL×1 瓶	4℃保存

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 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。

原理: 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。

自备用品:

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

粗酶液提取:

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 ES02 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 ES02), 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 ES02 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 ES02), 进行冰浴匀浆; 15000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 液体样本直接使用。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 400nm, 蒸馏水调零;
2. 标准液的稀释: 临用前将 5 μmol/mL 标准液用蒸馏水稀释至 300、200、100、50、25、10、0 nmol/mL 标准溶液待测;
3. 加样表:

试剂名称	测定管(ul)	对照管(ul)	标准管(ul)
AK045-A	120		

AK045-B	150	150	
样本	30	30	
迅速混匀，放入 37℃准确水浴 30min 后，立即放入 95℃水浴 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）			
AK045-A		120	
充分混匀，8000g，4℃，离心5min，取上清液			
上清液	70	70	
标准液			70
AK045-C	130	130	130
充分混匀，室温静置 2min 后，400nm 处测定吸光值 A，分别记为 A 测定、A 对照、A 标准、A 空白。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。每个测定管需设一个对照管。标准曲线和空白管只需测 1-2 次。			

β-GC 活力计算：

1. 标准曲线建立：

根据标准管的浓度（x，nmol/mL）和吸光度（y， $\Delta A_{\text{标准}}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ （y， $\Delta A_{\text{测定}}$ ）带入公式计算样本产物浓度 x（nmol/mL）。

2. 酶活力计算：

（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。

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

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒（Cat#: C05-02001）。

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每克组织每小时产生1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

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

（3）按细菌或细胞数量计算：

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。

$$\beta\text{-GC 活力(U/10}^4\text{ cell)} = (x \times V_{\text{反总}}) \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.02x$$

注：Cpr: 样本蛋白质浓度，mg/mL，蛋白浓度需要另外测定；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；500：细胞或细菌总数，500 万；T：反应时间，0.5h。

注意事项：

提取液中含有使蛋白变性的成分，故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。