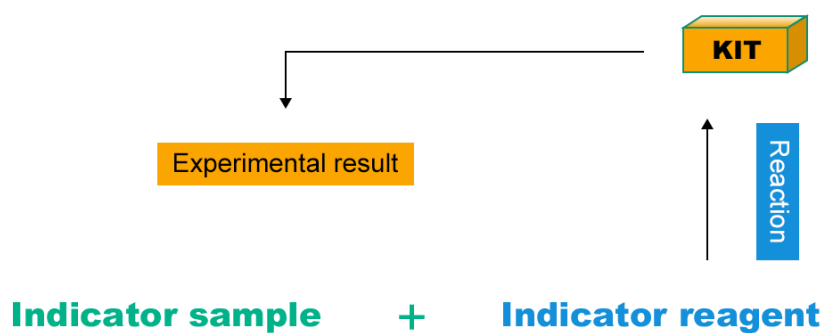


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0707

Size: 50T/24S

β -葡萄糖苷酶 (β -GC) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50mL $\times$ 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 $\times$ 2 瓶	-20°C 保存	临用前每瓶加入 10mL 双蒸水, 充分溶解备用; 用不完的试剂仍-20°C 保存。
试剂二	液体 25mL $\times$ 1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 80mL $\times$ 1 瓶	4°C 保存	
标准品	液体 1mL $\times$ 1 支	4°C 保存	5 μ mol/mL 的对硝基苯酚溶液

五、操作步骤：

● 样品的前处理：

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)：提取液体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例 (建议 1000 万细菌或细胞加入 1mL 提取液)，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 20min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1:5~10 的比例 (建议称取约 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。

● 标准样品的准备：

取 100 μ L 标准液，加入到 400 μ L 试剂三中，得到 1 μ mol/mL 标准液，十倍稀释到 100nmol/mL，用蒸馏水倍比稀释：50、25、12.5、6.25nmol/mL。100、50、25、12.5、6.25、0nmol/mL 做标准液。

● 测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零

2. 加样表

试剂名称 (μ L)	对照管	测定管	标准管
试剂一		400	
试剂二	500	500	
样本	100	100	
迅速混匀，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	400		
充分混匀，8000g，4℃，离心 5min，取上清液			
上清液	500	500	

标准液			500
试剂三	1000	1000	1000
充分混匀，室温静置 2min 后，400nm 处测定吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。			

六、 β -GC 活力单位的计算：

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

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

（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。

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

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒（ZC-S0470）。

（2）按样本鲜重计算：

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

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

（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。

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

C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，1mL； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； W ：样品鲜重，g；1000：细胞或细菌总数，1000 万； T ：反应时间，0.5h。