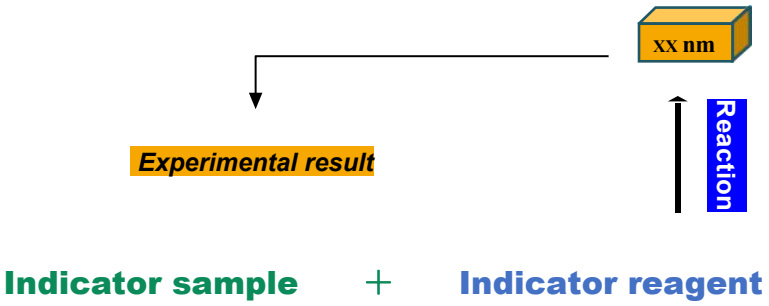
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0707　　规格：50管/24样

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

产品内容：

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×1瓶	4℃保存	-
试剂一	粉剂×2 瓶	-20℃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℃保存。
试剂二	液体 25mL×1瓶	4℃保存	-
试剂三	液体 80mL×1瓶	4℃保存	-
标准品	液体 1mL×1支	4℃保存	5μmol/mL 的对硝基苯酚溶液

产品简介：

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、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。

操作步骤：

一、样品的前处理：

a. 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。

b. 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。

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，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。

二、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（μL）	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ΔA=A 测定管-A 对照管。每个测定管需设一个对照管。			

三、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。

β-GC 活力(U/mg prot)=(y×V 反总)÷(V 样×Cpr)÷T=20×y÷Cpr

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 组织每小时产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

β-GC 活力(U/g 鲜重) = (y×V 反总)÷(W×V 样÷V 样总)÷T=20×y÷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。

β-GC 活力(U/10^4 cell)=(y×V 反总)÷(1000×V 样÷V 样总)÷T=0.02×y

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；V 反总：反应体系总体积，1mL；V 样：加入反应体系中样本体积， 0.1mL；V 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。