

组织及血液β-葡萄糖苷酶(β-GC) 活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHB3-C24	组织及血液 β-葡萄糖苷酶(β-GC) 试剂盒	24T	常量法

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。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	粉剂×2 瓶	-20℃ 保存
试剂二	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	液体 80 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃ 保存

溶液的配制:

- 1、试剂一: 临用前每瓶加入 10 mL 蒸馏水, 充分溶解; 用不完的试剂-20℃分装保存4 周, 避免反复冻融;
- 2、标准品: 5 μmol/mL 的对硝基苯酚溶液。

操作步骤:

一、样本处理

1、细菌或培养细胞的处理: 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200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 15000g, 4℃条件下离心20min, 取上清, 置冰上待测。

2、组织的处理: 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℃条件下离心20min, 取上清, 置冰上待测。

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、标准液的稀释: 临用前将 5 μmol/mL 标准液稀释至 100、50、25、12.5、6.25、0 nmol/mL 标准溶液待测。

3、标准液稀释可参考下表:

序号	稀释前浓度 (nmol/mL)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 (nmol/mL)
1	5000	100	400	1000
2	1000	200	1800	100
3	100	1000	1000	50
4	50	1000	1000	25
5	25	1000	1000	12.5
6	12.5	1000	1000	6.25
7	6.25	0	1000	0 (空白管)

备注：实验中每个标准管需500μL 标准溶液。

4、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℃水浴锅/恒温培养箱中准确水浴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，取上清液待测			
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，分别记为A测定、A对照、A标准、A空白。计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。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。			

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 (x, nmol/mL) 和吸光度 (y, ΔA标准)，建立标准曲线。根据标准曲线，将ΔA (y, ΔA测定) 带入公式计算样本产物浓度x (nmol/mL)。

2、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。

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

3、按样本质量计算

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。

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

4、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。

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

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, 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: 样本质量, g; 1000: 细胞或细菌总数, 1000万; T: 反应时间, 0.5h。