

β-葡萄糖苷酶 (β-Glucosidase, β-GC) /纤维二糖酶试剂盒

分光光度法 50 管/24 样

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

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。

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。

自备用品：

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。

试剂组成和配制：

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 蒸馏水，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 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

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)	测定管	对照管
试剂一	400	
蒸馏水		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 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），8000g，4℃，离心 5min，取上清液

上清液	500	500
试剂三	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。

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（10⁴ 个）：提取液体积（mL）为 500~1000: 1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），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），进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

3、培养液、血清（浆）等液体样本：直接检测。

β-GC 活力计算：

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.00543x - 0.0027$ ；x 为标准品浓度（nmol/mL），y 为吸光值。

（1）按液体体积计算：

单位的定义：每 mL 样本每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。β-GC 活性 (nmol/min/mL)=[(Δ A+0.0027) ÷ 0.00543 × V 反总] ÷ V 样 ÷ T

$$=61.39 \times (\Delta A + 0.0027)$$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。β-GC 活力 (nmol/min/mg prot)=[(Δ A+0.0027) ÷ 0.00543 × V 反总] ÷ (V 样 × Cpr) ÷ T

$$=61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div \text{Cpr}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(3) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。β-GC 活力 (nmol/min/g 鲜重)=[(Δ A+0.0027) ÷ 0.00543 × V 反总] ÷ (W × V 样 ÷ V 样总) ÷ T

$$=61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(4) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。β-GC 活力 (nmol/min/10⁴ cell)=[(Δ A+0.0027) ÷ 0.00543 × V 反总] ÷ (500 × V 样 ÷ V 样总) ÷ T

$$=0.123 \times (\Delta A + 0.0027)$$

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；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万；T：反应时间，30min。