

β-葡萄糖苷酶(β-GC)活性检测试剂盒说明书

β-glucosidase Assay Kit

分光光度法

货号: AK044

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

货号	规格	储存条件
提取液 ES02	50mL×1 瓶	4℃保存
AK044-A	粉剂×2 瓶	-20℃保存; 临用前每瓶加入10mL 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。
AK044-B	25mL×1 瓶	4℃保存
AK044-C	80mL×1 瓶	4℃保存
AK044-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、1ml 玻璃比色皿、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)
AK044-A	400		
AK044-B	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)			
AK044-A		400	
充分混匀, 8000g, 4℃, 离心5min, 取上清液			
上清液	500	500	
标准液			500
AK044-C	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 ΔA 测定=A 测定-A 对照, ΔA 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。			

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, 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. 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: C_{pr}: 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。