

β-葡萄糖苷酶 (β-Glucosidase, β-GC) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存; 临用前每瓶加入 12mL 蒸馏水, 充分溶解备用; 用不完的试剂仍-20℃ 保存。

试剂二: 液体 15mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 液体 15mL×1 瓶, 4℃ 保存。

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。

测定步骤

1、分光光度计或酶标仪预热 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	120	
蒸馏水		120
试剂二	150	150
样本	30	30

充分混匀, 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 (在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂)

上清液	70	70
试剂三	130	130

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。

β-GC 活力计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.00585x - 0.0027$ ；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。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 56.98 \times (\Delta A + 0.0027)$$

(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性单位。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 56.98 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

(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性单位。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 56.98 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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性单位。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.114 \times (\Delta A + 0.0027)$$

V 反总：反应体系总体积，0.3mL；V 样：加入反应体系中样本体积，0.03mL；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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0039x - 0.0027$ ；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。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 85.47 \times (\Delta A + 0.0027)$$

(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性单位。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 85.47 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

(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性单位。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$=85.47 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

(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性单位。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 0.171 \times (\Delta A + 0.0027)$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.3mL; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.03mL; 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。