

β-Glucosidase Activity Assay Kit

β-葡萄糖苷酶 (β-GC) 试剂盒说明书

货号:BN72125 | 方法: 可见分光法 | 规格: 24 样

一、产品简介:

β-葡萄糖苷酶 (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, 催化水解β-D-葡萄糖键, 与植物细胞生长发育过程中壁的松弛和加固有关, 也与植物细胞的识别和一些信号分子的产生有联系。

β-葡萄糖苷酶 (β-GC) 可以水解对-硝基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷生成对-硝基苯酚 (PNP), 后者在 405nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率来计算β-葡萄糖苷酶活性。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前加 2.5mL 蒸馏水溶解, 4°C保存。
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 32mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

四、β-葡萄糖苷酶 (β-GC) 的活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本: 取约 0.1g 组织 (水分充足的果实样本取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌或细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 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); 12000 rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) 或水浴锅 (25°C) 中孵育 10min, 在 EP 管中依次加入:

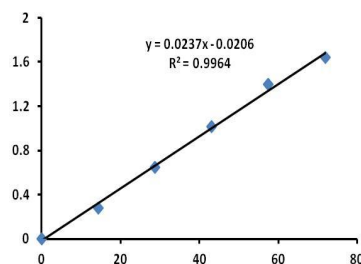
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	80	
蒸馏水		80
试剂二	100	100

迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	600	600
混匀, 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 405nm 处测定吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调; 针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0237x - 0.0206$; x 是 PNP 摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、按样本蛋白浓度计算:

定义: 每毫克组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0206) \div 0.0237] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ = 70.32 \times (\Delta A + 0.0206) \div \text{Cpr} \times D$$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每克组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0206) \div 0.0237] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 70.32 \times (\Delta A + 0.0206) \div W \times D$$

4、按细菌或细胞密度计算:

定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0206) \div 0.0237] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 0.14 \times (\Delta A + 0.0206) \times D$$

5、按液体体积计算:

定义: 每毫升样本每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚 (PNP) 定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0206) \div 0.0237] \div V1 \div T \times D = 70.32 \times (\Delta A + 0.0206) \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 20 μ L=0.02mL;

W---样本质量, g;

500---细胞或细菌总数, 万;

T---反应时间, 30min;

PNP 对分子质量---139.11;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。