

β-葡萄糖苷酶 (β-Glucosidase, β-GC) 试剂盒说明书

(货号: G0522F 分光法 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 (10^4): 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:

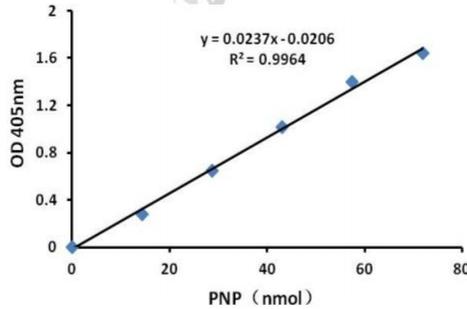
试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
样本	20	20	
试剂一	80		80
蒸馏水		80	20
试剂二	100	100	100
迅速混匀, 37°C保温 30min			
试剂三	600	600	600

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， $\Delta A = A - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ （每个测定管需设一个对照管）。

【注】若 ΔA 较小，可以增加 37°C 保温反应时间（如 1 小时）或者增加样本上样量（如增至 60 μ L，则试剂二相应减少），则改变后的反应时间 T 或加样体积 V1 需重新代入公式计算。

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 。



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。

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

$$= 70.32 \times (\Delta A + 0.0206) \div Cpr \times D$$

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。

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

$$= 70.32 \times (\Delta A + 0.0206) \div W \times D$$

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。

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

$$= 0.14 \times (\Delta A + 0.0206) \times D$$

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。

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

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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（2mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管中依次加入：20 μ L 标准品+80 μ L 蒸馏水+100 μ L 试剂二+600 μ L 试剂三，混匀，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。