

β-葡萄糖苷酶 (β-Glucosidase, β-GC) 试剂盒说明书

(货号: G0522W 微板法 48 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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 2.5mL 蒸馏水溶解, 4℃ 保存
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 32mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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。15000rpm, 4℃ 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); 15000 rpm 4℃ 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 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

- 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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

- ② 在 EP 管中依次加入:

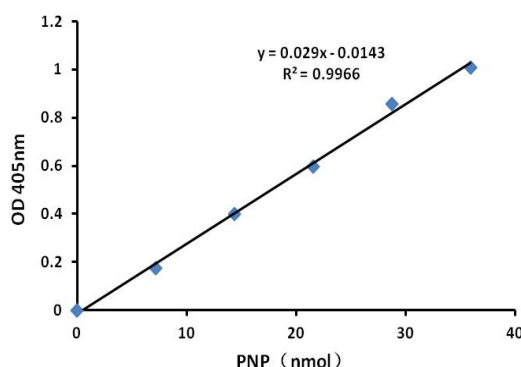
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	40	
蒸馏水		40
试剂二	50	50
迅速混匀, 37℃ 保温 30min		
试剂三	300	300
混匀, 取 200μL 至 96 孔板中, 405nm 处测定吸光值 A, ΔA=A 测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

【注】若 ΔA 较小, 可以增加 37℃ 保温反应时间 (如 1 小时), 或者增加样本上样量 (如增至 30μL,

则试剂二相应减少), 则改变后的反应时间 T 或加样体积 V1 需重新代入计算公式计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.029x - 0.0143$; x 是 PNP 摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 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。

β -GC 活性(nmol/min/mg prot) = $[(\Delta A + 0.0143) \div 0.029] \div (V1 \times Cpr) \div T = 114.9 \times (\Delta A + 0.0143) \div Cpr$

3、按样本鲜重计算:

单位定义: 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。

β -GC 活性(nmol/min/g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.0143) \div 0.029] \div (W \times V1 \div V) \div T = 114.9 \times (\Delta A + 0.0143) \div W$

4、按细菌或细胞密度计算:

单位定义: 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。

β -GC 活性(nmol/min/ 10^4 cell) = $[(\Delta A + 0.0143) \div 0.029] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.23 \times (\Delta A + 0.0143)$

5、按液体体积计算:

单位定义: 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。

β -GC 活性(nmol/min/mL) = $[(\Delta A + 0.0143) \div 0.029] \div V1 \div T = 114.9 \times (\Delta A + 0.0143)$

V----加入提取液体积, 1mL;

V1----加入反应体系中样本体积, 10 μ L=0.01mL;

W---样本质量, g;

500---细胞或细菌总数, 500 万;

T---反应时间, 30min;

PNP 对分子质量----139.11。

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 (1mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水。
- 2 把母液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 管加入: 10 μ L 标准品+40 μ L 蒸馏水+50 μ L 试剂二+300 μ L 试剂三, 混匀, 取 200 μ L 至 96 孔板中, 于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。