

## $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -Glucosidase, $\beta$ -GC) /纤维二糖酶试剂盒

分光光度法 50 管/24 样

**注 意：**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：

$\beta$ -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  $\beta$ -糖苷键水解，具有多方面生理作用：在纤维素的糖化作用中， $\beta$ -GC 负责进一步水解纤维素二糖和纤维素寡糖生成葡萄糖； $\beta$ -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； $\beta$ -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：

$\beta$ -GC 分解对-硝基苯- $\beta$ -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  $\beta$ -GC 活性。

### 自备用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：粉剂×2 瓶，-20℃ 保存；临用前每瓶加入 10mL 蒸馏水，充分溶解备用；用不完的试剂仍-20℃ 保存。

试剂二：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

### 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、 加样表

试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管	对照管
试剂一	400	
蒸馏水		400
试剂二	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)，8000g，4℃，离心 5min，取上清液

上清液	500	500
试剂三	1000	1000

充分混匀，室温静置 2min 后，400nm 处测定吸光值 A，计算  $\Delta A=A$  测定管-A 对照管。每个测定管需设一个对照管。

### 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<sup>4</sup> 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。

### β-GC 活力计算:

标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.00543x - 0.0027$ ;  $x$  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。β-GC 活力 (nmol/min/mL) =  $[(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T$

$$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027)$$

#### (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力单位。β-GC 活力 (nmol/min/mg prot) =  $[(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$

$$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div C_{\text{pr}}$$

需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

#### (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力单位。β-GC 活力 (nmol/min/g 鲜重) =  $[(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$$= 61.39 \times (\Delta A + 0.0027) \div W$$

#### (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力单位。β-GC 活力 (nmol/min/10<sup>4</sup> cell) =  $[(\Delta A + 0.0027) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$$= 0.123 \times (\Delta A + 0.0027)$$

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 1mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入反应体系中样本体积, 0.1mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $C_{\text{pr}}$ : 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。