Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd
Tel: 400-968-6088
Fax: 010-56371281
Http://www.solarbio.com

β-葡萄糖苷酶（β-GC）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2560

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂二	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 80 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

1、试剂一：临用前每瓶加入 10 mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；

2、标准品：5 μmol/mL 的对硝基苯酚溶液。

产品说明：

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。

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。

$$\text{p-Nitrophenyl β-D-Glucopyranoside} \xrightarrow{\text{β-GC}} \text{p-Nitrophenol(400nm)}$$

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、超声破碎仪、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、细菌或培养细胞的处理：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（10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 1000 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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；15000g，4℃条件下离心 20min，取上清，置冰上待测。

2、组织的处理：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 0.2g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。15000g，4℃条件下离心 20min，取上清，置冰上待测。

二、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、 标准液的稀释：临用前将 5 μmol/mL 标准液稀释至 100、50、25、12.5、6.25、0 nmol/mL 标准溶液待测。

3、 标准液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度（nmol/mL）	标准液体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度（nmol/mL）
1	5000	100	400	1000
2	1000	200	1800	100
3	100	1000	1000	50
4	50	1000	1000	25
5	25	1000	1000	12.5
6	12.5	1000	1000	6.25
7	6.25	0	1000	0（空白管）

备注：实验中每个标准管需 500μL 标准溶液。

4、 加样表：

试剂名称（μL）	对照管	测定管	标准管
试剂一	-	400	-
试剂二	500	500	-
样本	100	100	-
迅速混匀，放入37℃水浴锅/恒温培养箱中准确水浴30min后，立即放入沸水浴中煮沸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）			
试剂一	400	-	-
充分混匀，8000g，4℃离心5min，取上清液待测			
上清液	500	500	-
标准液	-	-	500
试剂三	1000	1000	1000
充分混匀，室温静置2min后，400nm处测定吸光值A，分别记为A测定、A对照、A标准、A空白。计算ΔA测定=A测定-A对照，ΔA标准=A标准-A空白。每个测定管需设一个对照管。标准曲线和空白管只需测1-2次。			

三、β- GC 活力单位的计算

1、标准曲线建立：

根据标准管的浓度（x，nmol/mL）和吸光度（y，ΔA标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将ΔA（y，ΔA测定）带入公式计算样本产物浓度x（nmol/mL）。

2、按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

β-GC活力(U/mg prot)=(x×V反总)÷(V样×Cpr)÷T=20x÷Cpr

3、按样本质量计算

单位的定义：每g组织每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

β-GC活力(U/g 质量) =(x×V反总)÷(W×V样÷V样总)÷T=20x÷W

4、按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞每小时产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

β-GC活力(U/10^4 cell)=(x×V反总)÷(1000×V样÷V样总)÷T=0.02x

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，蛋白浓度需要另外测定；V反总：反应体系总体积，1mL；V样：加入反应体系中样本体积，0.1mL；V样总：加入提取液体积，1mL；W：样本质量，g；1000：细胞或细菌总数，1000万；T：反应时间，0.5h。

相关发表文献：

[1] Yu Qian,Jiale Song,Peng Sun,et al. Lactobacillus casei Strain Shirota Enhances the In Vitro Antiproliferative Effect of Geniposide in Human Oral Squamous Carcinoma HSC-3 Cells. Molecules. 2018;(IF3.06)

[2] Zhang Q A, Shi F F, Yao J L, et al. Effects of ultrasound irradiation on the properties of apricot kernels during accelerated debitterizing[J]. RSC Advances, 2020, 10(18): 10624-10633.

参考文献：

[1] Faria M L, Kolling D, Camassola M, et al. Comparison of Pennicillium echinulatum and Trichoderma reesei cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates[J]. Biores. Technol, 2008, 99: 1417-1424.

相关系列产品：

BC0340/BC0345 糖原含量检测试剂盒

BC0360/BC0365 β-1,3葡聚糖酶（β-1,3-GA）活性检测试剂盒

BC2510/BC2515 海藻糖酶（THL）活性检测试剂盒