

β-葡萄糖苷酶 (β-Glucosidase, β-GC) 试剂盒说明书

(货号: BP10303W 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前加 2.5mL 蒸馏水溶解; 2. 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 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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℃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 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 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℃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。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上 (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 405nm。

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

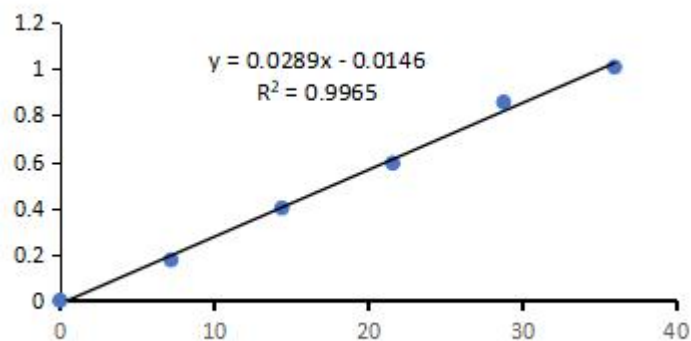
试剂组分 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
样本	10	10	

试剂一	40		40
蒸馏水		40	10
试剂二	50	50	50
迅速混匀, 37°C保温 30min			
试剂三	300	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-A 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 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 需重新代入公式计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0289x - 0.0146$; x 是 PNP 摩尔质量 (nmol), y 是ΔA。



2、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。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0146) \div 0.0289] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 115.34 \times (\Delta A + 0.0146) \div W \times D$$

3、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。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0146) \div 0.0289] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D = 115.34 \times (\Delta A + 0.0146) \div Cpr \times D$$

4、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。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0146) \div 0.0289] \div V1 \div T \times D = 115.34 \times (\Delta A + 0.0146) \times D$$

5、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。

$$\beta\text{-GC 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0146) \div 0.0289] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.231 \times (\Delta A + 0.0146) \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 10μL=0.01mL;

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（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：10μL 标准品+40μL 蒸馏水+50μL 试剂二+300μL 试剂三，混匀，取 200μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	10	0
蒸馏水	40	50
试剂二	50	50
试剂三	300	300
混匀，取 200μL 至 96 孔板中，405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{0 \text{ 浓度}}$ 。		