β-葡萄糖苷酶（β-GC）/纤维二糖酶活性检测试剂盒说明书

规格：24 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。
2. 正式检测前选取 2~3 个样本进行预检测。
3. 本试剂盒仅用于科研。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
提取液	30 mL×1	4℃	
试剂一	粉剂×1	-20℃	临用前每瓶加入 3 mL 蒸馏水，充分溶解备用；用不完的试剂仍-20℃保存。
试剂二	9 mL×1	4℃	
试剂三	8 mL×1	4℃	

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

四、样品制备

1. 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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液），进行冰浴匀浆。15000 g，4℃离心 10 min，置于冰上，上清为待测液。

2. 细菌/细胞：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌/细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细菌/细胞（功率 300 W，超声 3 秒，间隔 7 s，总时间 3 min）；然后 15000 g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测液。

3. 液体样本：澄清的液体的样本直接测定，若浑浊则离心后取上清液检测。

五、测定步骤

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 340 nm 处。
2. 在 1.5 mL 离心管中依次加入

	测定管	对照管

试剂一（μL）	120	-
超纯水/蒸馏水（μL）	-	120
试剂二（μL）	150	150
样本（μL）	30	30
充分混匀，放入 37℃准确水浴 30 min 后，立即放入 95℃水浴 5 min（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），8000 g，4℃，离心 5 min，取上清液（在 96 孔板中加入下列试剂）。		
上清液（μL）	70	70
试剂三（μL）	130	130
充分混匀，室温静置 2 min 后，400 nm 处测定吸光值，记作 A 测定管和 A 对照管，计算ΔA=A 测定管-A 对照管。每个测定管需设一个对照管。		

六、计算

标准方程

标准条件下测得回归方程为：y=0.0039x-0.0027；x 为标准品浓度（nmol/mL），y 为吸光值ΔA。

1. 按样本重量计算

酶活单位定义：每 g 组织每分钟产生 1 nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

β-葡萄糖苷酶活性（nmol/min/g 鲜重）=[（ΔA+0.0027）÷0.0039×V 反总]÷（W×V 样÷V 提取）÷T=85.47×（ΔA+0.0027）÷W

2. 按样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：每mg组织蛋白每分钟产生1 nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

β-葡萄糖苷酶活性（nmol/min/mg prot）=[（ΔA+0.0027）÷0.0039×V 反总]÷（V 样×Cpr）÷T=85.47×（ΔA+0.0027）÷Cpr

3. 按细菌/细胞数量计算

酶活单位定义：每1万个细菌或细胞每分钟产生1 nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

β-葡萄糖苷酶活性（nmol/min/10^4 cell）=[（ΔA+0.0027）÷0.0039×V 反总]÷（N×V 样÷V 提取）÷T=85.47×（ΔA+0.0027）÷N

4. 按样本体积计算

酶活单位定义：每mL样本每分钟产生1 nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

β-葡萄糖苷酶活性（nmol/min/mL）=[（ΔA+0.0027）÷0.0039×V 反总]÷V 样÷T=85.47×（ΔA+0.0027）

V 反总：反应体系总体积，0.3 mL；V 样：加入反应体系中样本体积，0.03 mL；V 提取：加入提取液体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌/细胞总数，万个；T：反应时间，30 min。

七、产品简介

β-葡萄糖苷酶是植物和微生物体内催化β-葡萄糖苷键水解的关键酶，属糖苷水解酶家族，以可溶态或与细胞壁结合形式存在于植物细胞质、液泡及胞外基质中。主要功能是催化植物体内多种β-糖苷类化合物（如纤维素二糖、水杨苷、皂苷及芳香族糖苷）末端β-葡萄糖苷键的水解断裂，释放游离葡萄糖和相应糖苷配基，在植物细胞壁纤维素降解、次生代谢物（如黄酮、萜类糖苷）的激活与再分配、植物防御反应中糖苷类前体的活化以及果实成熟过程中的风味物质释放中发挥重要作用，其活性还直接参与植物体内脱落酸（ABA）糖苷结合态与游离态的转化调控，在植物生长发育、逆境胁迫响应及品质形成中具有重要地位，是评价植物糖苷代谢活性、细胞壁降解能力及防御响应潜能的重要酶学指标。