CheKine™ β-葡萄糖苷酶（β-GC）活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1322　　规格: 48 T/24 S　96 T/48 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动植物组织、细菌、血清（浆）
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月

01 背景与原理

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。

本试剂盒检测原理是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 400 nm 有最大吸收峰，通过测定吸光值升高速率来计算β-GC 活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60×2 mL	4℃
Reagent Ⅰ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent Ⅱ	12 mL	24 mL	4℃
Reagent Ⅲ	11 mL	22 mL	4℃
Standard	1 mL	1 mL	4℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 400 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	PBS、去离子水	清洗样本/配制试剂、稀释标准品用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 该试剂盒提取的动植物组织样本也适用于 KTB1015、KTB1323、KTB1324 的测定。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent Ⅰ	临用前配制；48 T 加入 9.6 mL 去离子水，96 T 加入 19.2 mL 去离子水，充分溶解待用	未用完的试剂 20℃分装避光保存一个月，禁止反复冻融
Reagent Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅲ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Standard	5 μmol/mL 标准液，即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存

05-1-2 标准品配制

使用 5 μmol/mL 标准液，按照下表所示，进一步稀释标准品。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	标准品（μL）	去离子水（μL）	浓度（nmol/mL）
1	20 μL 5 μmol/mL	980	100
2	500 μL of 100 nmol/mL	500	50
3	500 μL of 50 nmol/mL	500	25
4	500 μL of 25 nmol/mL	500	12.5
5	500 μL of 12.5 nmol/mL	500	6.25
6	500 μL of 6.25 nmol/mL	500	3.125
7	500 μL of 3.125 nmol/mL	500	1.563
空白	0	500	0

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。

- **动植物组织：**称取约 0.1 g 组织样本，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，15000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。
- **细胞：**收集 5×10^6 个细胞，用冷 PBS 清洗细胞，800 g 离心 2 min，弃上清液。加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴超声波破碎细胞 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），15000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。
- **血清（浆）：**直接测定。若溶液有浑浊则离心后取上清进行测定。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 400 nm。
2. **检测体系配制**：在 1.5 mL EP 管中按照如下方式操作，标准曲线和空白管只需做 1-2 次。

试剂	测定管（μL）	对照管（μL）	标准管（μL）	空白管（μL）
Working Reagent Ⅰ	120	0	0	0
Reagent Ⅱ	150	150	0	0
去离子水	0	120	0	0
样本上清	30	30	0	0
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），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）				
Standard	0	0	70	0
去离子水	0	0	0	70
上清液	70	70	0	0
Reagent Ⅲ	130	130	130	130

3. **吸光度检测：**充分混匀，室温静置 2 min 后，于 400 nm 处测定吸光值，分别记为 $A_{测定}$、$A_{对照}$、$A_{标准}$和 $A_{空白}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn]>进入“**技术中心**”>查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线。将$\Delta A_{测定}$代入方程得到 y 值（nmol/mL）。

3. β-GC 活性的计算：

（1）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 1 nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$\beta\text{-GC (U/mg prot)}=(y\times V_{反总})\div(V_{样}\times Cpr)\div T=\mathbf{y\div Cpr\div 3}$

（2）按样本质量计算：

单位的定义：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。

$\beta\text{-GC (U/g)}=(y\times V_{反总})\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T=\mathbf{y\div W\div 3}$

（3）按细胞密度计算：

单位的定义：每 10^4 个细菌每分钟产生 1 nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$\beta\text{-GC (U/10}^4\text{)}=(y\times V_{反总})\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\div T=\mathbf{y\div N\div 3}$

（4）按样本体积计算

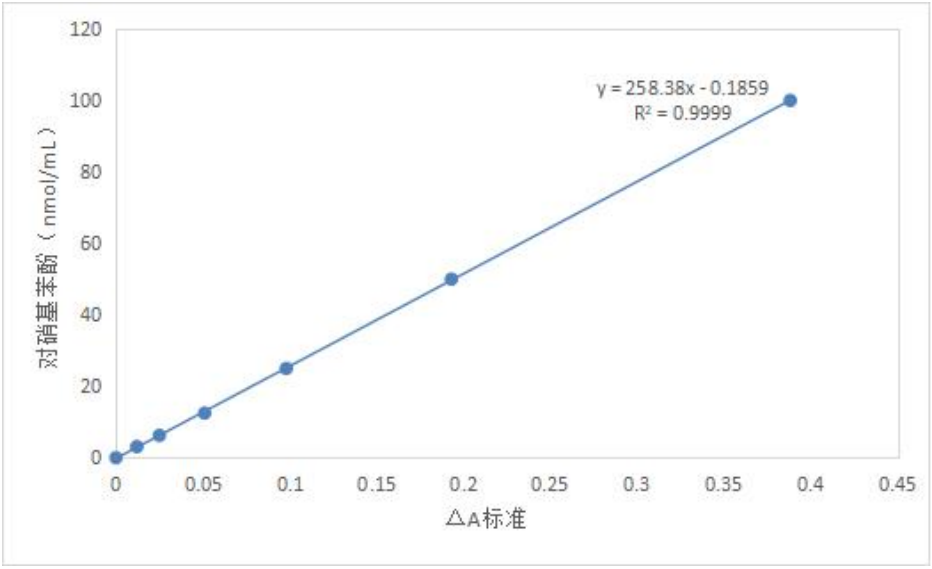
单位的定义：每 mL 液体样本每分钟产生 1 nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$\beta\text{-GC (U/mL)}=(y\times V_{反总})\div(V_{样}\div V_{样总})\div T=\mathbf{y\div 3}$

$V_{反总}$：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；$V_{样总}$：加入 Extraction Buffer 体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌数量，以 10^4 为单位（例如细菌数量为 5×10^6，N=500）；T：反应时间，30 min。

07 结果展示

典型标准曲线：



示例-1：取胎牛血清，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.313-0.077=0.236$，代入标准曲线，计算 y=60.79。计算得：$\beta\text{-GC (U/mL)}=(y\times V_{反总})\div(V_{样}\div V_{样总})\div T=\mathbf{y\div 3}=20.26$ U/mL。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔA $_{测定}$过高或者过低怎么办?**

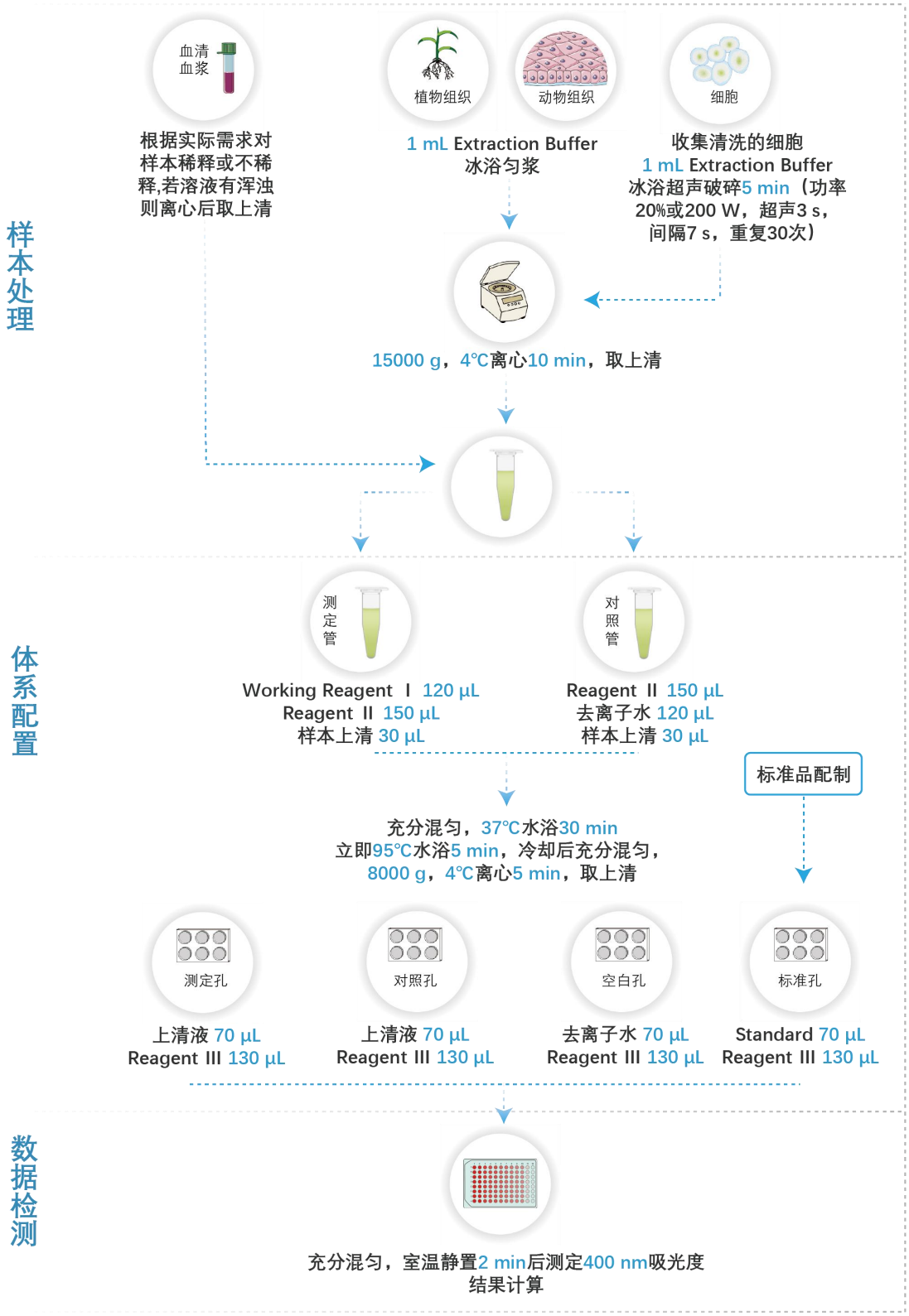
如果样本ΔA $_{测定}$>0.4，需用 Extraction Buffer 适当稀释或减少提取用样本量，重新进行测定。如果样本的ΔA $_{测定}$<0.01，可适当提高样本量。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1015	CheKine™ α-葡萄糖苷酶活性检测试剂盒（微量法）
KTB1121	CheKine™ 丙酮酸（PA）含量检测试剂盒（微量法）

CheKine™ β-葡萄糖苷酶（β-GC）活性检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1322）



V1.0