



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

β -葡萄糖苷酸酶

1、反应



缩写: PheP-Gluc = 葡萄糖醛酸苯酚

2、检测方法

2.1 条件: $T = 30^\circ \text{C}$, $\text{pH} = 5.0$, $A_{540\text{nm}}$, 光程 = 1 cm

2.2 方法: 光谱法终止测定

2.3 试剂:

2.3.1 100 mM 乙酸钠缓冲液, 在 37°C 条件下的 pH 值为 5.0
采用醋酸钠三水合物 (货号 S8625) 在去离子水中制备 50 mL。采用 1 M HCl 将 pH 在 37°C 下调至 5.0。

2.3.2 1.2 mM 葡萄糖醛酸苯酚底物溶液 (PheP-Gluc) 采用 8 mL 去离子水稀释 1 mL 葡萄糖醛酸苯酚而制备

2.3.3 200 mM 甘氨酸缓冲溶液, pH 10.4 采用去离子水和无甘氨酸碱制备 100 mL。在 37°C 下用 1 M NaOH 调节至 pH 10.4。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

2.3.4 0.2% (w/v) 氯化钠溶液 (NaCl), 采用氯化钠在去离子水中制备 20 mL。

2.3.5 β -葡萄糖醛酸酶溶液 须现用现配, 采用低温试剂 2.3.4 配制含 250-500 units/mL β -葡萄糖醛酸酶的溶液

2.3.6 95% (v/v) 乙醇采用去离子水和无水乙醇配制 20 mL。

2.3.7 0.05% (w/v) 酚酞标准溶液 (标准样溶液) 通过在试剂 2.3.6 中溶解 1.0 mg 酚酞制备 2 mL

2.4 反应体系:

2.4.1 将下列试剂(ml)加入适宜的培养皿中

	测试	空白样
试剂 A (缓冲液)	0.70	0.70
试剂 B (PheP-Gluc)	0.70	0.70



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

2.4.2 倒置混匀, 恢复至 37 ° C, 然后添加:

	测试	空白样
试剂 E (酶溶液)	0.10	-----

2.4.3 倒置混匀并在 37 ° C 下孵育整整 30 分钟。然后添加:

	测试	空白样
试剂 C (甘氨酸缓冲液)	5.00	5.00
试剂 E (酶溶液)	-----	0.10

2.4.4 立即倒置混匀。将溶液转移到适宜的容器中, 使用适宜的分光光度计记录试样和空白样的 A_{540nm}。

2.4.5 标准曲线: 将以下试剂加入适宜的容器中, 根据加样量 (ml) 绘制标准曲线:

	标准样 1	标准样 2	标准样 3	标准样 4	空白样
试剂 A (缓冲液)	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
试剂 B (PheP-Gluc)	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

试剂 G (标准样溶液)	0.03	0.05	0.07	0.10	-----
试剂 F (乙醇)	0.07	0.05	0.03	-----	0.10
试剂 C (甘氨酸缓冲液)	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00

2.4.6 倒置混匀并将标准样转移到适宜的容器中。使用适宜的分光光度计记录各标准样的 A_{540nm}。

3. 计算

3.1 标准曲线: 标准样 ΔA_{540} = 标准样 A₅₄₀ - 标准空白样 A₅₄₀, 通过比较标准样和酚酞的 mg 数, 绘制 ΔA_{540} 标准曲线。

3.2 样品测定: 样品 ΔA_{540} = 样品 A₅₄₀ - 空白样 A₅₄₀, 通过标准曲线确定释放的总酚酞量 (mg)。

$$\text{单位/mL 酶} = \frac{(\text{释放的酚酞 mg 数}) (2) (df)}{0.1}$$

2 = 依照单位定义, 从 30 分钟至 1 小时的换算系数 df = 稀释因子 0.1 = 所用的酶体积 (ml)

$$\text{单位/mg 固体} = \frac{\text{单位/mL 酶}}{\text{mg 固体/mL 酶}}$$

$$\text{单位/mg 蛋白} = U \frac{\text{单位/mL 酶}}{\text{mg 蛋白/mL 酶}}$$



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

4. 最终检测体系浓度:

在 1.50 mL 反应混合物中, 终浓度为 47 mM 醋酸钠、0.56 mM 葡萄糖醛酸酚酞和 25-50 单位 β -葡萄糖醛酸酶。