

β-葡聚糖 (β-Glucan) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

β-葡聚糖是由葡萄糖单位组成的多聚糖，它们大多数是通过β-1,3结合，天然存在于真菌、细菌和植物的细胞壁中。

测定原理:

依次使用地衣聚糖酶和β-葡萄糖苷酶水解β-葡聚糖生成葡萄糖，然后使用 GOD-POD 试剂测定葡萄糖的含量。

需自备的仪器和用品:

分光光度计、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、乙醇和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

试剂一：液体 30mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 75μL×1 瓶，4℃避光保存；临用前加入 1.5mL 试剂一，充分溶解待用，用不完的试剂分装后-20℃保存。

试剂三：液体 30mL×1 瓶，4℃保存。

试剂四：液体 6mL×1 瓶，4℃保存

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃避光保存；临用前加入 3mL 试剂四，充分溶解待用，用不完的试剂分装后-20℃保存。

试剂六：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 25mL 试剂八溶解待用，用不完的试剂 4℃保存；

试剂七：液体 25ml×1 瓶，4℃避光保存；

试剂八：液体 30ml×1 瓶，4℃保存；

标准液：0.1mg/mL 葡萄糖溶液 2mL×1 瓶，4℃保存；

样品测定的准备:

1、燕麦、小麦、纤维等干样:

样本充分烘干粉碎，过 40 目以上筛。取 0.05g 左右样本，加入 80%乙醇，充分震荡混匀后，95℃水浴加热 5min。取出冷却至室温，25℃ 3000g 离心 10min，去除上清。

沉淀中加入 0.8mL 试剂一，充分震荡混匀，95℃水浴加热 5min。取出冷却至室温，加入 50μL 试剂二，混匀后 50℃反应 60min。

反应结束后加入 1mL 试剂三，充分混匀，25℃ 5000g 离心 10min，取上清待测。

2、发酵液等液体样本:

取 0.5mL 样本，95℃水浴加热 5min。取出冷却至室温后，分次缓慢加入 0.8mL 95%乙醇，充分混匀，25℃ 3000g 离心 10min，去除上清。沉淀中再加入 0.8mL 50%乙醇，混匀后再次 25℃ 3000g 离心 10min，去除上清。

沉淀中加入 0.8mL 试剂一，再加入 50μL 试剂二，混匀后 50℃反应 60min。反应结束后加入 1mL 试剂三，充分混匀，25℃ 5000g 离心 10min，取上清待测。

测定步骤

1、分光光度计预热 30min，调节波长至 505nm，蒸馏水调零。

2、显色液配制：临用前将试剂六和试剂七按 1:1 的比例混合，用多少配多少。

3、按下表在 EP 管中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	100	100
试剂四		100
试剂五	100	
37°C 反应 40min, 然后 3000g 离心 5min, 取反应液待用		

在 EP 管中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
反应液	100	100		
标准液			100	
蒸馏水				100
显色液	900	900	900	900

充分混匀, 37°C 反应 15min, 测定 540nm 处吸光值, 分别记为 A 测定, A 对照, A 标准和 A 空白。计算 $\Delta A1 = A \text{ 测定} - A \text{ 对照}$, $\Delta A2 = A \text{ 标准} - A \text{ 空白}$ 。

β-葡聚糖含量计算:

1、按样本质量计算

$$\begin{aligned} \beta\text{-葡聚糖含量}(\text{mg/g 干重}) &= 0.1 \times \Delta A1 \div \Delta A2 \times V1 \div (W \times V2 \div V3) \\ &= 0.37 \times \Delta A1 \div \Delta A2 \div W \end{aligned}$$

2、按样本体积计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol 对硝基酚定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \beta\text{-葡聚糖含量}(\text{mg/mL}) &= 0.1 \times \Delta A1 \div \Delta A2 \times V1 \div (V4 \times V2 \div V3) \\ &= 0.74 \times \Delta A1 \div \Delta A2 \end{aligned}$$

V1: 反应总体积, 0.2mL; V2: 反应体系中样本体积, 0.1 mL; V3: 提取液总体积, 1.85 mL;
V4: 液体样本体积, 0.5mL; W: 样本质量, g。