

β-葡聚糖 (β-Glucan) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 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:

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、乙醇和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

试剂一: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 液体 150μL×1 瓶, 4°C 避光保存; 临用前加入 3mL 试剂一, 充分溶解待用, 用不完的试剂分装后-20°C 保存。

试剂三: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂四: 液体 12mL×1 瓶, 4°C 保存

试剂五: 粉剂×1 瓶, 4°C 避光保存; 临用前加入 6mL 试剂四, 充分溶解待用, 用不完的试剂分装后-20°C 保存。

试剂六: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 10mL 试剂八溶解待用, 用不完的试剂 4°C 保存;

试剂七: 液体 10ml×1 瓶, 4°C 避光保存;

试剂八: 液体 12ml×1 瓶, 4°C 保存;

标准液: 0.1mg/mL 葡萄糖溶液 2mL×1 瓶, 4°C 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°C 水浴加热 5min。取出冷却至室温, 25°C 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°C 水浴加热 5min。取出冷却至室温, 加入 50μL 试剂二, 混匀后 50°C 反应 60min。

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

2、发酵液等液体样本:

取 0.5mL 样本, 95°C 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°C 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°C 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°C 反应 60min。反应结束后加入 1mL 试剂三, 充分混匀, 25°C 5000g 离心 10min, 取上清待测。

测定步骤

1、酶标仪预热 30min, 调节波长至 505nm。

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 96 孔板中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
反应液	20	20		
标准液			20	
蒸馏水				20
显色液	180	180	180	180

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。