

## 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，禁止反复冻融；

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，禁止反复冻融；

试剂六：液体 25mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂七：液体 25mL×1 瓶，4℃避光保存。

#### 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 1mL 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 |
|-----------|-----|-----|
| 样本        | 100 | 100 |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 试剂四                                     |     | 100 |
| 试剂五                                     | 100 |     |
| 37°C 反应 20min, 然后 3000g 离心 5min, 取上清液待用 |     |     |

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 |
| 显色液       | 900 | 900 |

充分混匀, 37°C 反应 30min, 转移至 1mL 玻璃比色皿中测定 505nm 处吸光值, 记为 A 对照和 A 测定,  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

### β-葡聚糖含量计算:

标准条件下测定回归方程为  $y = 4.642x + 0.0053$ ,  $R^2 = 0.9999$ ; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

#### 1、按样本质量计算

$$\begin{aligned} \beta\text{-葡聚糖含量}(\text{mg/g 干重}) &= (\Delta A - 0.0053) \div 4.642 \times V1 \div (W \times V2 \div V3) \\ &= 0.797 \times (\Delta A - 0.0053) \div W \end{aligned}$$

#### 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。

$$\begin{aligned} \beta\text{-葡聚糖含量}(\text{mg/mL}) &= (\Delta A - 0.0053) \div 4.642 \times V1 \div (V4 \times V2 \div V3) \\ &= 1.594 \times (\Delta A - 0.0053) \end{aligned}$$

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。