

β-1,3 葡聚糖酶 (β-1,3-glucanase, β-1,3-GA) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

注 意：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-1,3-GA(EC 3.2.1.73)主要存在植物中，催化 β-1,3-葡萄糖苷键水解。在植物染病或处于其他逆境条件下，可诱导细胞大量合成 β-1,3-GA，因此 β-1,3-GA 活性测定广泛应用于植物病理和逆境生理研究。

测定原理：

β-1,3-GA 水解昆布多糖，内切 β-1,3-葡萄糖苷键，产生还原末端，通过测定还原糖生成速率来计算其酶活性。

自备仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 3mL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂二：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存；

粗酶液提取：

1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。12000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 550nm，蒸馏水调零。

2、样本测定（在 1.5mL EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
蒸馏水		100
试剂一	100	

充分混匀，放入 37℃ 水浴 60 min

试剂二	600	600
-----	-----	-----

充分混匀，95℃ 水浴 5min（盖紧，防止水分散失），流水冷却，550nm 处记录各管吸光值 A，如果吸光值大于 2，可以用蒸馏水稀释后测定（计算公式乘以相应稀释倍数）， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

β-1,3-GA 活性计算:

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0958x - 0.0192$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

2、血清(浆) β-1,3-GA 活力的计算

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0958 \times V1] \div V1 = 10.438 \times (\Delta A + 0.0192)$$

3、细胞、细菌和组织中 β-1,3-GA 活力的计算

(1) 按蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每小时产生 1mg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0958 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 10.438 \times (\Delta A + 0.0192) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每小时产生 1mg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.09585 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 10.438 \times (\Delta A + 0.0192) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每小时产生 1mg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0958 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0208 \times (\Delta A + 0.0192)$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.1mL; V2: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本鲜重, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。