

β-1,3葡聚糖酶 (β-1,3-glucanase, β-1,3-GA) 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-1,3-GA(E C 3.2.1.73)主要存在于植物中，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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存；

试剂一：粉剂×1瓶，4°C保存；临用前加入2mL蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂4°C保存；

试剂二：液体30mL×1瓶，4°C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（10⁴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°C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°C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. 分光光度计或酶标仪预热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	35	35
蒸馏水		35
试剂一	35	

充分混匀，放入37°C水浴60 min

试剂二	230	230
-----	-----	-----

充分混匀，95°C水浴5min（盖紧，防止水分散失），流水冷却，取200 μ L至微量石英比色皿或96孔板中，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：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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

单位的定义：每mL血清（浆）每小时产生1mg还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-GA(mg/h/mL)} = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0958 \times V_1] \div V_1 = 10.438 \times (\Delta A + 0.0192)$$

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。

$$\beta\text{-1,3-GA(mg/h/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0958 \times V_1] \div (V_1 \times C_{pr}) = 10.438 \times (\Delta A + 0.0192) \div C_{pr}$$

(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。

$$\beta\text{-1,3-GA(mg/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0958 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) = 10.438 \times (\Delta A + 0.0192) \div W$$

(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。

$$\beta\text{-1,3-GA(mg/h /104 cell)} = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0958 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) = 0.0208 \times (\Delta A + 0.0192)$$

V_1 ：加入反应体系中样本体积，0.035mL； V_2 ：加入提取液体积，1mL； C_{pr} ：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。

b.用96孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0479x - 0.0192$ ；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

单位的定义：每mL血清（浆）每小时产生1mg还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-GA(mg/h/mL)} = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0479 \times V_1] \div V_1 = 20.876 \times (\Delta A + 0.0192)$$

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。

$$\beta\text{-1,3-GA(mg/h/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0479 \times V_1] \div (V_1 \times C_{pr}) = 20.876 \times (\Delta A + 0.0192) \div C_{pr}$$

(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。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0479 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) = 20.876 \times (\Delta A + 0.0192) \div W$$

(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。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0479 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) = 0.0416 \times (\Delta A + 0.0192)$$

V₁: 加入反应体系中样本体积, 0.035mL; V₂: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr}: 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。