

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 (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/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℃ 保存;

试剂一: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 2mL 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 (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℃ 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℃ 水浴 60 min

试剂二	230	230
-----	-----	-----

充分混匀, 95℃ 水浴 5min (盖紧, 防止水分散失), 流水冷却, 取 200μL 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), ΔA=A 测定-A 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。

$$\beta\text{-1,3-GA(mg/h/10}^4\text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0958 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) = 0.0208 \times (\Delta A + 0.0192)$$

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。

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。

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

(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。

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

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。

上海抚生实业有限公司
<http://www.affandi-e.com>