

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

(货号: ADS-W-TDX012-96 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

β-1,3 葡聚糖酶 (β-1,3-GA, EC 3.2.1.39) 主要存在于植物中, 催化β-1,3-葡萄糖苷键水解, 进而破坏真菌细胞壁, 特别是与几丁质酶的协同作用下, 可明显抑制真菌的生长。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, 以增强植物体对不良外界刺激产生抗性反应, 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。

β-1,3-GA 水解昆布多糖的β-1,3-葡萄糖苷键, 产生还原末端。利用 3,5 二硝基水杨酸测定还原糖的量, 在 540nm 读取吸光值, 进而得出β-1,3 葡聚糖酶的活性。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 8mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 4.5mL 试剂一, 充分溶解待用; 3. 用不完的试剂 4℃保存。
试剂三	液体 60mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、β-1,3 葡聚糖酶 (β-1,3-GA) 活性测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本: 称取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入经预冷的 1mL 的 80%乙醇混匀, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液, 涡旋混匀, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 10min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。

② 细菌/真菌样本: 先收集细菌/真菌到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌/真菌加入 1mL 提取液; 冰浴超声波破碎细菌/真菌 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 也可按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取)

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入下列试剂：

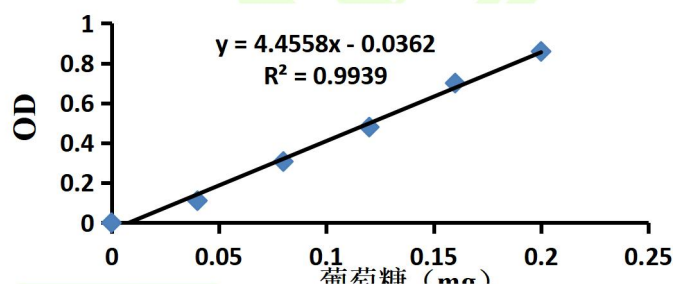
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	20	
煮沸样本*		20
试剂二	20	20
充分混匀，放入 37℃水浴 30 min。		
试剂三	300	300
混匀，95℃水浴 5min（可用封口膜缠紧，防止水分散失），流水冷却至室温。		
蒸馏水	560	560
混匀，取 200μL 至 96 孔板中，540nm 处记录各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本一个对照管）。		

【注】：1.煮沸样本*：将同一个样本在沸水（98-100℃）中煮沸 15 分钟，以将酶彻底灭活，再 12000rpm，4℃离心 10min；上清液备用。

2.若 ΔA 很小在零附近徘徊，可在样本提取时加大取样质量 W（由 0.2g 增加到 0.5g 等），或增加样本加样量 V1（由 20μL 增加到 100μL，相应的蒸馏水减少，保持总体积 900μL 不变），或延长 37℃水浴时间 T（由 30min 增至 60min），则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 4.4558x - 0.0362；x 为标准品质量（mg），y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟分解昆布多糖产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0362) \div 4.4558 \times 10^3] \div (V1 \times Cpr) \div T = 374 \times (\Delta A + 0.0362) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟分解昆布多糖产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0362) \div 4.4558 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T = 374 \times (\Delta A + 0.0362) \div W$$

4、按细菌/真菌密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或真菌每分钟分解昆布多糖产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0362) \div 4.4558 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.75 \times (\Delta A + 0.0362)$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升样本每分钟分解昆布多糖产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0362) \div 4.4558 \times 10^3] \div V1 \div T = 374 \times (\Delta A + 0.0362)$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，20μL = 0.02mL； T---30min；

W---样本鲜重，g； 500---细菌/真菌总数，500 万； 葡萄糖分子量---180.16；

Cpr---样本蛋白质浓，mg/mL； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（10mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 2, 4, 6, 8, 10. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表（标准品替换样本，且试剂二换成蒸馏水）操作，根据结果即可制作标准曲线。