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

（货号：ADS-F-TDX012-48　分光法 48 样 有效期：6 个月）

一、产品简介：

β-1,3 葡聚糖酶（β-1,3-GA，EC 3.2.1.39)主要存在植物中，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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 用前加入 3mL 试剂一，充分溶解待用； 2. 用不完的试剂 4℃保存；
试剂三	液体 30mL×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、所需的仪器和用品：

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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入下列试剂：

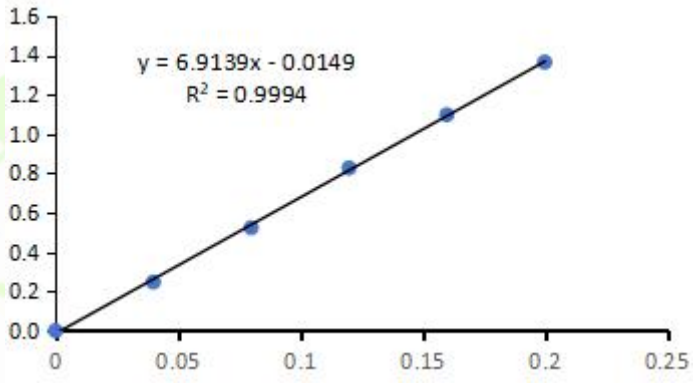
试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	20	
煮沸样本*		20
试剂二	20	20
充分混匀，放入 37℃水浴 30 min。		
试剂三	300	300
混匀，95℃水浴 5min（可用封口膜缠紧，防止水分散失），流水冷却至室温。		
蒸馏水	560	560
混匀，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，540nm 处记录各管吸光值 A，ΔA=A 测定-A 对照（每个测定管对应一个对照管）。		

【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，可在样本制备时加大取样质量 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 = 6.9139x - 0.0149；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。

β-1,3-GA(μg/min/mg prot)=[(ΔA+0.0149)÷6.9139×10³]÷(V1×Cpr) ÷T=241.1×(ΔA+0.0149)÷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。

β-1,3-GA(μg/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0149)÷6.9139×10³]÷(W×V1÷V) ÷T=241.1×(ΔA+0.0149)÷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。

β-1,3-GA(μg/min /10⁴ cell)=[(ΔA+0.0149)÷6.9139×10³]÷(500×V1÷V) ÷T=0.482×(ΔA+0.0149)

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。

β-1,3-GA(μg/min/mL)=[(ΔA+0.0149)÷6.9139×10³]÷V1÷T=241.1×(ΔA+0.0149)

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　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），标准品母液浓度为 10mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 2, 4, 6, 8, 10. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2　标品稀释参照表如下：

标品浓度 mg/mL	0	2	4	6	8	10
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3　依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	20	
蒸馏水	20	40
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，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，540nm 处记录各管吸光值 A，△A=A 测定-0 浓度管。		