

β -1,3 葡聚糖酶 (β -1,3-GA) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10138

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 42 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液配制:

1. 试剂一: 临用前加 3 mL 蒸馏水溶解, 用不完的试剂 4°C保存;
2. 标准品: 10 mg 无水葡萄糖, 临用前加入 1 mL 蒸馏水溶解, 配制成 10 mg/mL 葡萄糖溶液备用, 4°C可保存 1 周。

产品说明:

β -1,3-GA(EC 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。

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。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

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/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:**一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)**

1. 组织 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。

2. 细菌或细胞: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
- 2、标准品的准备: 将标准品用蒸馏水稀释至 1、0.8、0.6、0.4、0.2mg/mL。
- 3、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	标准管	空白管
样本	100	100		
标准液			100	
蒸馏水		100	100	200
试剂一	100			
充分混匀，放入 37°C 水浴 60min。				
试剂二	600	600	600	600

充分混匀，沸水浴 5min（盖紧，防止水分散失），流水冷却，540nm 处记录各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

如果吸光值大于 2，可以用提取液对样本稀释后测定（计算公式乘以相应稀释倍数）。

三、 β -1,3-GA 活性计算

1、标准曲线的建立：

根据标准管吸光度 x（A 标准管-A 空白管）和浓度（y，mg/mL）建立标准曲线，将 ΔA 带入公式中计算出样本中产生的还原糖的含量 y 值（mg/mL）。

2、 β -1,3-GA 活性计算：

(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。

$$\beta\text{-1,3-GA(U/mg prot)} = (y \times V1) \div (V1 \times Cpr) \div T = y \div Cpr$$

(2) 按样本质量计算

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。

$$\beta\text{-1,3-GA(U/g 质量)} = (y \times V1) \div (W \times V1 \div V2) \div T = y \div W$$

(3) 按细菌或细胞数量计算

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

$$\beta\text{-1,3-GA(U/10}^4\text{ cell)} = (y \times V1) \div (500 \times V1 \div V2) \div T = 0.002 \times y$$

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：样本质量，g；T：反应时间，60min=1h；500：细菌或细胞总数，万。

相关发表文献：

[1] X Niu, Q Xu, W Wang, et al. The antifungal activity of a thaumatin-like protein from oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Survival Journal*. June 2018;(IF0.967)

参考文献：

[1] Mohammadi M, Karr A L. Beta-1, 3-glucanase and chitinase activities in soybean root nodules[J]. *Journal of plant physiology*, 2002, 159(3): 245.