

## $\beta$ -1,3 葡聚糖酶 ( $\beta$ -1,3-glucanase, $\beta$ -1,3-GA) 试剂盒说明书

### 分光光度法 50 管/24 样

**注 意：**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：

$\beta$ -1,3-GA (EC 3.2.1.73) 主要存在植物中，催化  $\beta$ -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  $\beta$ -1,3-GA，因此  $\beta$ -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：

$\beta$ -1,3-GA 水解昆布多糖，内切  $\beta$ -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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

#### 试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃保存；临用前加入 3mL 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 ( $10^4$  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 ( $\mu$ L) | 测定管 | 对照管 |
|-----------------|-----|-----|
| 样本              | 100 | 100 |
| 蒸馏水             |     | 100 |
| 试剂一             | 100 |     |

充分混匀，放入 37℃ 水浴 60 min

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 试剂二 | 600 | 600 |
|-----|-----|-----|

充分混匀，95℃ 水浴 5min（盖紧，防止水分散失），流水冷却，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。

#### **$\beta$ -1,3-GA 活性计算：**

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） $\beta$ -1,3-GA 活力的计算

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

3、细胞、细菌和组织中  $\beta$ -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。

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

（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。

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

（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。

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

$V_1$ ：加入反应体系中样本体积，0.1mL； $V_2$ ：加入提取液体积，1mL；Cpr：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。