

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

(货号: G0526W 微板法 96 样)

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 8mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C 保存	用前加入 4.5mL 试剂一, 充分溶解待用; 用不完的试剂 4°C 保存;
试剂三	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调试移液器、台式离心机、水浴锅、移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、β-1,3 葡聚糖酶 (β-1,3-GA) 活性测定:

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°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 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°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 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°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 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°C 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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

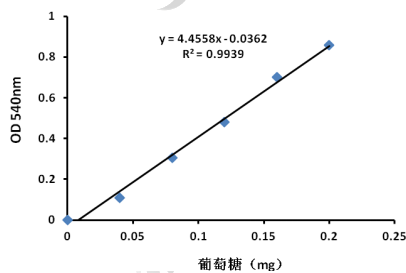
③ 煮沸样本的制备: 可取至少 200μL 待检测样本上清液于 95-100°C 煮沸 10min 后, 于室温或 4°C×12000rpm 离心 10min, 上清液即为对照管的待检液。

④ 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°C 水浴 30 min。		
试剂三	300	300
混匀, 95°C 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, ΔA=A 测定-A 对照 (每个样本一个对照管)。		

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 (母液保存两天且 -20°C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度标准品: 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。