

**$\beta$ -1,3 葡聚糖酶 ( $\beta$ -1,3-glucanase,  $\beta$ -1,3-GA) 试剂盒说明书****微量法 100 管/48 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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

**试剂组成和配制：**

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃保存；临用前加入 2mL 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、分光光度计或酶标仪预热 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（μL） | 测定管 | 对照管 |
|----------|-----|-----|
| 样本       | 35  | 35  |
| 蒸馏水      |     | 35  |
| 试剂一      | 35  |     |

充分混匀，放入 37℃ 水浴 60 min

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 试剂二 | 230 | 230 |
|-----|-----|-----|

充分混匀，95℃ 水浴 5min（盖紧，防止水分散失），流水冷却，取 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中，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。

**β-1,3-GA 活性计算：**
**a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下**

- 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）β-1,3-GA 活力的计算

单位的定义：每 mL 血清（浆）每小时产生 1mg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0958 \times V1] \div V1 = 10.438 \times (\Delta A + 0.0192)$$

- 3、细胞、细菌和组织中 β-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。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0958 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 10.438 \times (\Delta A + 0.0192) \div \text{Cpr}$$

**(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。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0958 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 10.438 \times (\Delta A + 0.0192) \div W$$

**(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。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0958 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0208 \times (\Delta A + 0.0192)$$

V1：加入反应体系中样本体积，0.035mL；V2：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。

**b.用 96 孔板测定的计算公式如下**

1、标准条件下测定回归方程为  $y = 0.0479x - 0.0192$ ;  $x$  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

单位的定义: 每 mL 血清 (浆) 每小时产生 1mg 还原糖定义为一个酶活性单位。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0479 \times V1] \div V1 = 20.876 \times (\Delta A + 0.0192)$$

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。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0479 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 20.876 \times (\Delta A + 0.0192) \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0479 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 20.876 \times (\Delta A + 0.0192) \div W$$

(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。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\text{mg/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0192) \div 0.0479 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0416 \times (\Delta A + 0.0192)$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.035mL; V2: 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。