

β-1,3 葡聚糖酶(β-1,3-GA)活性检测试剂盒说明书

β-1,3-glucanase Assay Kit

分光光度法

货号: AK038

规格: 50T / 24S

产品组成及保存条件:

	规格	储存条件
提取液 ES03	液体 50mL×1 瓶	4℃保存
AK038-A	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;
AK038-B	液体 45mL×1 瓶	4℃保存
AK038-标准品	粉剂×1 支	4℃保存; 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℃可保存 1 周。

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 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。

原理: 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。

自备用品:

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。

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 ES03 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 ES03), 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); 15000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 组织: 按照组织质量 (g): 提取液 ES03 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 ES03), 进行冰浴匀浆; 15000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

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 EP 管中依次加入下列试剂):

试剂名称 (ul)	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
AK038-A	100			
充分混匀, 放入 37℃水浴 60 min				
AK038-B	600	600	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， $\Delta A=A$ 测定-A 对照。

注：每个测定管需设一个对照管，标准曲线和空白管只需做 1-2 次。

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。

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

(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。

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

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