

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

(货号: BP10287F 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

### 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 60mL×1 瓶 | 4℃避光保存 |                                                               |
| 试剂一  | 液体 6mL×1 瓶  | 4℃避光保存 |                                                               |
| 试剂二  | 粉剂 1 瓶      | 4℃保存   | 1. 用前加入 3mL 试剂一, 充分溶解待用;<br>2. 用不完的试剂 4℃保存;                   |
| 试剂三  | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃避光保存 |                                                               |
| 标准品  | 粉剂 1 支      | 4℃保存   | 1. 若重新做标曲, 则用到该试剂;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>3. 溶解后的标品一周内用完。 |

### 三、所需的仪器和用品:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃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 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。

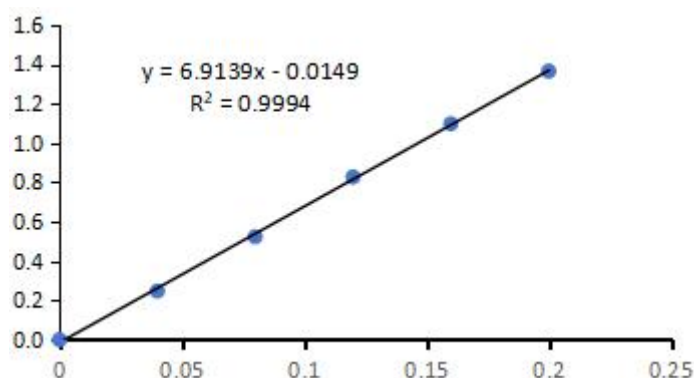
② 在 EP 管中依次加入下列试剂:

| 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，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，540nm 处记录各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管对应一个对照管）。 |     |     |

- 【注】：1.煮沸样本\*：将同一个样本在沸水（98-100°C）中煮沸 15 分钟，以将酶彻底灭活。再 12000rpm，4°C 离心 10min；上清液备用。
- 2.若  $\Delta A$  很小在零附近徘徊，可在样本制备时加大取样质量 W（由 0.2g 增加到 0.5g 等），或增加样本加样量 V1（由 20μL 增加到 100μL，相应的蒸馏水减少，保持总体积 900μL 不变），或延长 37°C 水浴时间 T（由 30min 增至 60min），则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 6.9139x - 0.0149$ ；x 为标准品质量（mg），y 为  $\Delta A$ 。



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。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0149) \div 6.9139 \times 10^3] \div (V1 \times Cpr) \div T = 241.1 \times (\Delta A + 0.0149) \div Cpr$$

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。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0149) \div 6.9139 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T = 241.1 \times (\Delta A + 0.0149) \div W$$

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。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\mu\text{g}/\text{min} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0149) \div 6.9139 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.482 \times (\Delta A + 0.0149)$$

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。

$$\beta\text{-1,3-GA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0149) \div 6.9139 \times 10^3] \div V1 \div T = 241.1 \times (\Delta A + 0.0149)$$

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 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存），标准品母液浓度为 10mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 2, 4, 6, 8, 10. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

|               |     |     |     |     |     |     |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品浓度<br>mg/mL | 0   | 2   | 4   | 6   | 8   | 10  |
| 标品稀释液<br>uL   | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL          | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。     |     |     |     |     |     |     |

3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

|                                                                          |     |              |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 试剂名称 (μL)                                                                | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
| 标品                                                                       | 20  |              |
| 蒸馏水                                                                      | 20  | 40           |
| 充分混匀，放入 37℃水浴 30 min。                                                    |     |              |
| 试剂三                                                                      | 300 | 300          |
| 混匀，95℃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，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，540nm 处记录各管吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。 |     |              |