

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0705

Size: 50T/24S

β -1,3 葡聚糖酶 (β -1,3-GA) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

β -1,3-GA (EC 3.2.1.73) 主要存在植物中, 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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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 42mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	含 10mg 无水葡萄糖（干燥失重<0.2%），临用前加入 1mL 蒸馏水溶解，配制成 10mg/mL 葡萄糖溶液备用，4℃可保存 1 周，或者用饱和苯甲酸溶液溶解，可保存更长时间。
标准品准备：将标准品用蒸馏水稀释至 1、0.8、0.6、0.4、0.2mg/mL。			

五、操作步骤：

● 粗酶液提取：

组织：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。

细菌或细胞：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）2000g 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) 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	标准管	空白管
样本	100	100		
标准液			100	
蒸馏水		100	100	200
试剂一	100			
充分混匀，放入 37°C 水浴 60min。				
试剂二	600	600	600	600

充分混匀，沸水浴 5min（盖紧，防止水分散失）流水冷却，540nm 处记录各管吸光值 A，如果吸光值大于 2，可以用提取液对样本稀释后测定（计算公式乘以相应稀释倍数） $\Delta A=A$ 测定-A 对照。每个测定管需设一个对照管。

六、 β -1,3-GA 活性计算：

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品中产生的还原糖的含量 y 值 (mg/mL)

(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) 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细胞或细菌每小时产生 1mg 还原糖定义为一个酶活性单位。

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

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, 万; T: 反应时间: 1h。