

几丁质酶试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX017-48 微板法 48 样)

一、产品简介:

多种微生物、动物、植物等都可产生几丁质酶, 高等植物本身不存在作为真菌细胞壁组分之一的几丁质, 但当植物受到病原菌感染时, 几丁质酶活性迅速提高。因此该酶与植物对病原微生物的抗性有关, 是重要的病程相关蛋白。

几丁质酶主要水解几丁质多聚体中 β -1,4-糖苷键, 在蜗牛酶的作用下全部水解为 N-乙酰氨基葡萄糖单体, 进一步与铁氰化钾反应, 于 420nm 处检测, 进而计算得到几丁质酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 5mL 盐酸充分混匀溶解后, 再加 5.5mL 蒸馏水混匀备用。
试剂三	粉体 1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 2mL×1 支	4°C保存	
试剂五	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	粉体 1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 24mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉剂 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、天平、水浴锅、低温离心机、盐酸、蒸馏水。

四、几丁质酶活性测定:

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 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 于 4°C, 12000rpm 离心 10min, 取上清置冰上待测。
- ② 真菌样本: 先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细胞加入 1mL 提取液; 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 于 4°C, 12000rpm 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照提取液 (mL): 细细胞数量 (10^4) 为 1: 500~1000 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 420nm。在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	80	
煮沸样本		80
试剂一	80	80
试剂二	100	100
混匀, 37°C (恒温培养箱) 孵育 1.5h, 4000rpm 离心 5min, 取上清		

③ 在 EP 管中依次加入：

上清液	150	150
试剂三	10	10
试剂四	15	15
混匀，37°C 孵育 1h		
试剂五	50	50
混匀，4000rpm 离心 5min，取上清液待测，		

④ 在 EP 管中依次加入：

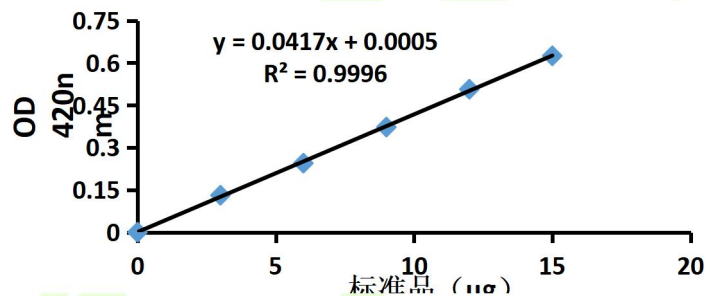
上清液	150	150
试剂六	200	200
混匀，95-100°C 煮沸 10min，取 200μL 至 96 孔板中于 420nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A$ 对照 - A 测定（每个样本做一个自身对照）。		

【注】1. 煮沸的样本：取出部分上清液于 95-100°C 煮沸 10min，使样本里面的酶失去活性。

2. 若 ΔA 较小，可以加大样本量（如增至 120μL，则试剂一相应减少），或增加样本取样量（如增至 0.2g），则改变后的 V1 和样本质量 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0417x + 0.0005$ ，X 是标准品质量（μg），y 是 ΔA 。



2、按照样本重量计算：

定义：每克组织每小时分解几丁质产生 1μgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

几丁质酶活(μg/h/g 鲜重)=[$(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.6$] \div (V1 \div V \times W) \div T = 519.6 \times ($\Delta A - 0.0005$) \div W

3、按照蛋白质浓度计算：

定义：每毫克蛋白每小时分解几丁质产生 1μgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

几丁质酶活(μg/h/mg prot)=[$(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.6$] \div (V1 \times Cpr) \div T = 519.6 \times ($\Delta A - 0.0005$) \div Cpr

4、按细胞数量计算：

定义：每 10⁴ 个细胞每小时分解几丁质产生 1μgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

几丁质酶活(μg/h/10⁴ cell)=[$(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.6$] \div (V1 \div V \times 细胞数量) \div T
= 519.6 \times ($\Delta A - 0.0005$) \div 细胞数量

5、按照液体体积计算：

定义：每毫升液体每小时分解几丁质产生 1μgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

几丁质酶活(μg/h/mL)=[$(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.6$] \div V1 \div T = 519.6 \times ($\Delta A - 0.0005$)

V---提取液体积，1mL； V1---样本体积，0.08mL； T---反应时间，1.5h；

W---样本质量，g； 2.6---体积系数； 标准品分子量---221.21；

Cpr---样本蛋白浓度，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（1mg/mL）：标准品临用前加 2mL 蒸馏水，即为 1mg/mL。
- 2 把母液稀释成以下浓度：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/mL。

- 依据第④步骤的加样体系：150 μ L 标准品+200 μ L 试剂六，混匀，95-100 $^{\circ}$ C煮沸 10min，取 200 μ L 至 96 孔板中于 420nm 处读取各管吸光值 A，标准品的质量作为横坐标，0 mg/mL 对应 A 值减去各浓度标准品对应 A 值之差作为纵坐标，即可得出标准曲线。

