

几丁质外切酶试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX052 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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。依据水解位置的不同可分为几丁质内切酶和几丁质外切酶, 几丁质外切酶作用于几丁质后, 生成 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外切酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉体 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 5mL 盐酸充分混匀溶解后; 3. 再加 5.5mL 蒸馏水混匀备用; 4. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉体 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 24mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

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)、96 孔板、离心管、酶标仪、盐酸、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、几丁质外切酶活性测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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℃, 12000rpm 离心 10min, 取上清置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照提取液体积(mL): 组织质量(g) 为 1: 5~10 的比例进行提取

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℃, 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): 细胞数量(10^4) 为 1: 500~1000 的比例进行提取

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 420nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	80	
煮沸的样本		80
试剂一	80	80
试剂二	100	100
混匀，37°C（恒温培养箱）孵育 1.5h 后，4000rpm 离心 5min，取上清		

③ 在 EP 管中依次加入：

上清液	175	175
试剂三	50	50
混匀，4000rpm 离心 5min，取上清液待测		

④ 在 EP 管中依次加入：

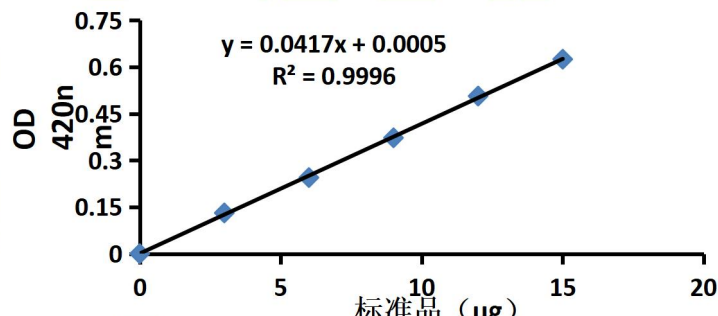
上清液	150	150
试剂四	200	200
混匀，95-100°C煮沸 8min，取 200μL 至 96 孔板中于 420nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1. 煮沸的样本：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。

$$\text{几丁质外切酶}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.23] \div (V1 \div V \times W) \div T$$

$$= 445.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div W$$

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。

$$\text{几丁质外切酶}(\mu\text{g/h/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.23] \div (V1 \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 445.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{几丁质外切酶}(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.23] \div (V1 \div V \times \text{细胞数量})$$

$$= 445.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div \text{细胞数量}$$

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； 2.23---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梯度的标准品: 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/mL。
- 3 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 8min, 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 对应的 A 值减去各浓度标准品对应的 A 之差作为纵坐标, 即可得出标准曲线。