

几丁质酶活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

货号：BC0825

规格：100T/48S

产品内容：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存，使用前摇匀。

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：粉剂×1 瓶。5mg N-乙酰氨基葡萄糖，4℃ 保存。临用前加入 2.27mL 蒸馏水配成 10 μ mol/mL 的标准溶液。

产品说明：

几丁质酶要存在于虾、蟹、昆虫等甲壳类动物的外壳与软体动物的器官(例如乌贼的软骨)，以及真菌类的细胞壁中。而几丁质酶(EC 3.2.1.14)可催化几丁质水解，具有抵御真菌侵染的作用，成为抗真菌病害的研究热点。

几丁质酶水解几丁质产生 N-乙酰氨基葡萄糖，进一步与 3,5-二硝基水杨酸产生棕红色化合物，在 540nm 处有特征吸收峰，吸收值增加速率反映了几丁质酶的活性。

自备实验用品及仪器

天平、水浴锅、离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、蒸馏水。

操作步骤：

一、粗酶液提取

1. 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，然后 10000g，4℃ 离心 20min，取上清，置冰上待测。
2. 真菌：按照细胞数量 (10⁴个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7 s，总时间 3min）；然后 10000g，4℃，离心 20min，取上清置于冰上待检。
3. 培养液：直接测定。

二、测定操作表

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min。波长调至 540nm，蒸馏水调零。
- 2、将标准溶液稀释为 5、4、3、2、1 μ mol/mL 的标准溶液备用。
- 3、在 EP 管中分别加入：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
样品 (μ L)	100	100	-	-
标准溶液 (μ L)	-	-	100	-

蒸馏水 (μL)	-	-	-	100
试剂一 (μL)	100	-	100	100
混匀, 37°C 水浴 1h, 沸水浴 5min。				
试剂一 (μL)	-	100	-	-
8000rpm 常温离心 10min, 分别取上清液 160μL 于新的 EP 管中, 再加入下列试剂				
试剂二 (μL)	40	40	40	40
混匀, 沸水浴反应 10min, 立即置于冰上至室温。于微量玻璃比色皿或 96 孔板中测定每管在 540nm 下的吸光度, 记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。				

三、计算公式

1、标准曲线的绘制:

以 ΔA 标准为 y 轴, 标准溶液浓度为 x 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$ 。将 ΔA 测定带入标准方程中, 得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)

2、几丁质酶活的计算:

(1) 按照样本重量计算

酶活性定义: 37°C 下, 每 g 组织每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{mol}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

$$\text{几丁质酶活性 (U/g 鲜重)} = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = x \div W。$$

(2) 按照蛋白质浓度计算

酶活性定义: 37°C 下, 每 mg 蛋白每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{mol}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

$$\text{几丁质酶活性 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = x \div C_{\text{pr}}。$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活性定义: 37°C 下, 每 10^4 个细胞每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{mol}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

$$\text{几丁质酶活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = x \div \text{细胞数量}。$$

(4) 按照培养液体积计算

酶活性定义: 37°C 下, 每 mL 培养液每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{mol}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

$$\text{几丁质酶活性 (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = x。$$

V 样: 反应体系中样本体积, 0.1mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; T: 反应时间, 1h; 细胞数量: 以万计。

注意事项:

1、反应结束后尽快进行比色。

2、OD 值大于 1.5, 样品适当稀释再测定, 注意计算公式里乘以稀释倍数; 或者缩短 37°C 水浴时间到 X 小时 (如 0.5 小时), 按照原先计算公式得到的结果再除以 X。