

# 几丁质酶试剂盒说明书

(分光法 24 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 $\beta$ -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 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 7mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 2.5mL 盐酸充分混匀溶解后，再加 2.8mL 蒸馏水混匀备用。
试剂三	粉体 mg×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 8mL×1 支	4°C保存	
试剂五	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	粉体 g×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 30mL 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：

分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、天平、水浴锅、低温离心机、盐酸、蒸馏水。

## 四、几丁质酶活性测定：

建议实验前选 2 个样本做预测定，了解样品情况，熟悉实验流程，避免样本和试剂浪费！

### 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 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 420nm，蒸馏水调零。
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	对照管
样本	80	
煮沸样本		80
试剂一	100	100
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	200	200
试剂三	20	20
试剂四	150	150
混匀，37°C 孵育 1h		
试剂五	100	100
混匀，4000rpm 离心 5min，取上清液待测，		

④ 在 EP 管中依次加入：

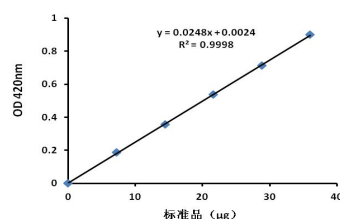
上清液	360	360
试剂六	480	480
混匀，95-100°C 煮沸 10min，取全部液体至 1mL 比色皿中于 420nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ （每个样本做一个对照）。		

【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  $\Delta A$  较小，可以加大样本量（如增至 120 $\mu$ L，则试剂一相应减少），或增加样本取样量（如 0.2g），则改变后的 V1 和样本 W 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0248x + 0.0024$ ，X 是标准品质量（ $\mu$ g），y 是  $\Delta A$ 。



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 1 $\mu$ gN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

几丁质酶活( $\mu$ g/h/g 鲜重)=[ $(\Delta A - 0.0024) \div 0.0248 \times 1.83$ ] $\div (V1 \div V \times W) \div T = 614.9 \times (\Delta A - 0.0024) \div W$

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 1 $\mu$ gN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

几丁质酶活( $\mu$ g/h/mg prot)=[ $(\Delta A - 0.0024) \div 0.0248 \times 1.83$ ] $\div (V1 \times Cpr) \div T = 614.9 \times (\Delta A - 0.0024) \div Cpr$

4、按细胞数量计算：

定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞每小时分解几丁质产生 1 $\mu$ gN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

几丁质酶活( $\mu$ g/h/10<sup>4</sup> cell)=[ $(\Delta A - 0.0024) \div 0.0248 \times 1.83$ ] $\div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T$   
 $= 614.9 \times (\Delta A - 0.0024) \div \text{细胞数量}$

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 1 $\mu$ gN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

几丁质酶活( $\mu$ g/h/mL)=[ $(\Delta A - 0.0024) \div 0.0248 \times 1.83$ ] $\div V1 \div T = 614.9 \times (\Delta A - 0.0024)$

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； 1.83---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：360 $\mu$ L 标准品+480 $\mu$ L 试剂六，混匀，95-100°C 煮沸 10min，取全部液体至 1mL 比色皿中于 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。