

几丁质酶试剂盒说明书

(货号: BN72295 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 mg×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 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 2mL×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 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, 了解本批样品和实验流程, 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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 420nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

③ 煮沸样本的制备: 可取至少 200 μ L 待检测样本上清液于 95-100°C煮沸 10min 后, 于室温或 4°C×12000rpm 离心 10min, 上清液即为对照管的待检液。

④ 在 EP 管中依次加入:

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

试剂名称 (μL)	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:

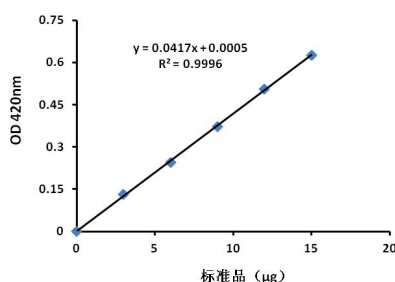
上清液	150	150
试剂三	10	10
试剂四	15	15
混匀, 37°C 孵育 1h		
试剂五	50	50
混匀, 4000rpm 离心 5min, 取上清液待测,		

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, $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

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 10^4 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/ 10^4 cell) = $[(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.6] \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \div T$
 $= 519.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div \text{细胞数量}$

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 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。

本产品仅用于科研

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。
- 3 以上面不同浓度点为横坐标（x），对应的 ΔA 标准为纵坐标（y）绘制标准曲线，得到线性回归方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中计算 x（mg/mL）。