

Chitinase Exonuclease Activity kit

几丁质外切酶试剂盒说明书

货号:BN72297 | 方法:微板法 | 规格: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。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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃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	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉体 g×1 瓶	4℃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℃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、几丁质外切酶活性测定:

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℃,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 细菌或细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取 500 万细菌或细胞加入 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):细细胞数量(10^4)为 1:500~1000 的比例进行提取。

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℃)。

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℃煮沸 10min 后,于

室温或 4℃×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：

试剂名称 (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℃（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：

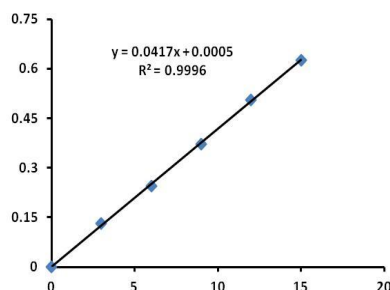
上清液	150	150
试剂四	200	200
混匀，95-100℃煮沸 8min，若有沉淀，于 12000rpm 室温离心 5min，取 200μL 至 96 孔板中于 420nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ 测定（每个样本做一个自身对照）。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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。

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

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

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 $1\mu\text{gN}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

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。