

几丁质酶 (Chitinase) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

几丁质主要存在于虾、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。

测定原理:

几丁质酶水解几丁质产生 N-乙酰氨基葡萄糖, 进一步与对二甲氨基苯甲醛产生红色化合物, 在 585nm 处有特征吸收峰, 吸光值增加速率反映了几丁质酶的活性。

组成:

产品名称	GMS053-100T/48S	Storage
提取液: 液体	105ml	4°C
试剂一: 液体	5ml	4°C
试剂二: 液体	5ml	4°C
试剂三: 液体	5ml	4°C
试剂四: 液体	10ml	4°C避光
说明书	一份	

试剂二: 液体 5ml×1 瓶, 4°C保存。(若出现结晶, 可 80°C左右加热溶解后使用)

自备仪器和用品:

天平、水浴锅、离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、甲苯 (土壤样品专用) 和蒸馏水。

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°C离心 20min, 取上清, 置冰上待测。
2. 真菌: 按照细胞数量 (10^4 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 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 10000g, 4°C, 离心 20min, 取上清置于冰上待测。
3. 培养液: 直接测定。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



测定操作表：

	对照管	测定管
粗酶液 (μl)	80	80
提取液 (μl)	120	40
试剂一 (μl)		80
混匀, 37°C水浴 1h		
试剂二 (μl)	40	40
混匀, 沸水浴 7min, 5000rpm, 4°C, 离心 10min, 取上清 200μl。		
试剂三 (μl)	40	40
试剂四 (μl)	80	80
混匀, 37°C, 15min, 于微量石英比色皿/96孔板, 测定 A ₅₈₅ , ΔA=A 测定-A 对照。		

计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y=0.3088-0.003x$, $R^2=0.9995$

计算公式:

1、按照样本重量计算

酶活性定义: 37°C条件下, 每克组织每小时分解几丁质产生 1mg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 8.096 \times (\Delta A + 0.003) \div W \end{aligned}$$

2、按照蛋白质浓度计算

酶活定义: 37°C条件下, 每毫克蛋白每小时分解几丁质产生 1mg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h mg prot)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 8.096 \times (\Delta A + 0.003) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算

酶活定义: 37°C条件下, 每 10⁴ 个细胞每小时分解几丁质产生 1mg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h / 10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \\ &= 8.096 \times (\Delta A + 0.003) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4、按液体体积计算

酶活定义: 37°C条件下, 每毫升培养液每小时分解几丁质产生 1mg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

$$\text{几丁质酶活性 (mg/h / ml)} = (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 8.096 \times (\Delta A + 0.003)$$

V_{反总}: 反应体系总体积, 1ml; V_样: 反应体系中样本体积, 0.4ml; V_{样总}: 加入提取液体积, 1ml; W: 样本质量, g; C_{pr}: 样本蛋白浓度, mg/ml

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y=0.1544x-0.003$, $R^2=0.9995$

计算公式:



4、按照样本重量计算

酶活性定义：37°C条件下，每克组织每小时分解几丁质产生 1mg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.1544 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 16.192 \times (\Delta A + 0.003) \div W \end{aligned}$$

5、按照蛋白质浓度计算

酶活定义：37°C条件下，每毫克蛋白每小时分解几丁质产生 1mg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h mg prot)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 16.192 \times (\Delta A + 0.003) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

6、按细胞数量计算

酶活定义：37°C条件下，每 10⁴ 个细胞每小时分解几丁质产生 1mg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h /10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \\ &= 16.192 \times (\Delta A + 0.003) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4、按液体体积计算

酶活定义：37°C条件下，每毫升培养液每小时分解几丁质产生 1mg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

$$\text{几丁质酶活性 (mg/h /ml)} = (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 16.192 \times (\Delta A + 0.003)$$

V 反总：反应体系总体积，1ml；V 样：反应体系中样本体积，0.4ml；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

注意事项：

- 1、反应结束后立即进行比色。
- 2、试剂四有一定的毒性，请操作时做好防护措施。

