

几丁质外切酶试剂盒说明书

(货号: G0547F 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 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 7mL×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 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	液体 14mL×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 30mL 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:

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

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 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℃, 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 可见分光光度计预热 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 (μ L)	测定管	对照管
样本	120	
煮沸的样本		120
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	200	200
试剂三	270	270
混匀，4000rpm 离心 5min，取上清液待测		

④ 在 EP 管中依次加入：

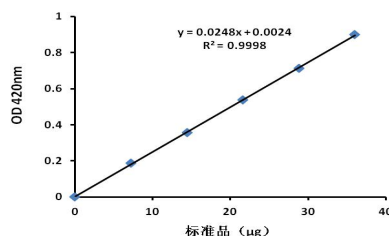
上清液	360	360
试剂四	480	480
混匀，95-100℃煮沸 8min，取全部液体至 1mL 比色皿中于 420nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A$ 对照 - A 测定(每个样本做一个自身对照)。		

【注】1. 煮沸的样本：于 95-100℃煮沸 10min，使样本里面的酶失去活性。

2. 若 ΔA 较小，可以加大样本量（如增至 140 μ 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 (μ g)，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 1 μ gN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{几丁质外切酶活性}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0024) \div 0.0248 \times 1.96] \div (V1 \div V \times W) \div T \\ &= 439.1 \times (\Delta A - 0.0024) \div W \end{aligned}$$

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 μ gN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{几丁质外切酶活性}(\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0024) \div 0.0248 \times 1.96] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 439.1 \times (\Delta A - 0.0024) \div Cpr \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

定义：每 10⁴ 个细胞每小时分解几丁质产生 1 μ gN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{几丁质外切酶活性}(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0024) \div 0.0248 \times 1.96] \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \\ &= 439.1 \times (\Delta A - 0.0024) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---样本体积，0.12mL； T---反应时间，1.5h；

1.96---体积系数； W---样本质量，g； 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 μ L 标准品+480 μ L 试剂六，混匀，95-100℃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。