几丁质外切酶试剂盒说明书

（货号：G0547W 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。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 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 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 200μL 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		

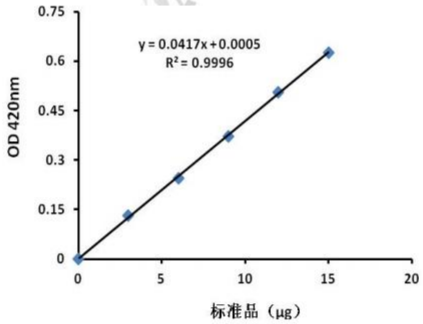
④ 在 EP 管中依次加入：

上清液	150	150
试剂四	200	200
混匀，95-100℃煮沸 8min，取 200μL 至 96 孔板中于 420nm 处读取各管吸光值 A，ΔA=A 对照-A 测定（每个样本做一个自身对照）。		

【注】1.若ΔA 小于 0.01，可以加大样本量 V1（如增至 120μL，则试剂一相应减少），或增加样本取样量 W（如至 0.2g），则改变后的 V1 和 W 需代入公式重新计算。

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。

几丁质外切酶(μg/h/g 鲜重)=[(ΔA-0.0005)÷0.0417×2.23]÷(V1÷V×W)÷T

=445.6×(ΔA-0.0005)÷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。

几丁质外切酶(μg/h/mg prot)=[(ΔA-0.0005)÷0.0417×2.23]÷(V1×Cpr)÷T

=445.6×(ΔA-0.0005)÷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。

几丁质外切酶(μg/h/10^4 cell)=[(ΔA-0.0005)÷0.0417×2.23]÷(V1÷V×细胞数量)

=445.6×(ΔA-0.0005)÷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。

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：150μL 标准品+200μL 试剂六，混匀，95-100℃煮沸 8min，取 200μL 至 96 孔板中于 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。