

## Chitinase Activity Kit

### 几丁质酶试剂盒说明书

货号: G0546W | 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 $\beta$ -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, 可-20°C分装冻存, 尽量避免反复冻融。
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℃）。
- 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，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℃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：

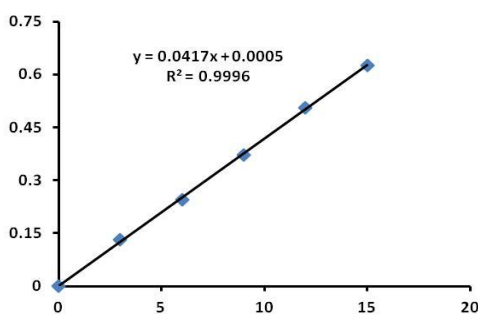
上清液	150	150
试剂六	200	200
混匀，95-100℃煮沸 10min，若有沉淀，于 12000rpm 室温离心 5min，取 200μL 至 96 孔板中于 420nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A$ 测定（每个样本做一个自身对照）。		

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  $\Delta A$ 。



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。

几丁质酶活(μg/h/g 鲜重)=[ $(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.6$ ] ÷ (V1 ÷ V × W) ÷ T = 519.6 × ( $\Delta A - 0.0005$ ) ÷ 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。

几丁质酶活( $\mu\text{g/h/mg prot}$ )= $[(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.6] \div (V1 \times Cpr) \div T = 519.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div Cpr$

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  $1\mu\text{gN}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

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

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  $1\mu\text{gN}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

几丁质酶活( $\mu\text{g/h/mL}$ )= $[(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.6] \div V1 \div T = 519.6 \times (\Delta A - 0.0005)$

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。

