

Chitinase Exonuclease Activity kit

几丁质外切酶试剂盒说明书

货号: G0547W | 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°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	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	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°C, 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°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

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°C)。

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°C煮沸 10min 后, 于

室温或 4°C×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°C (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		

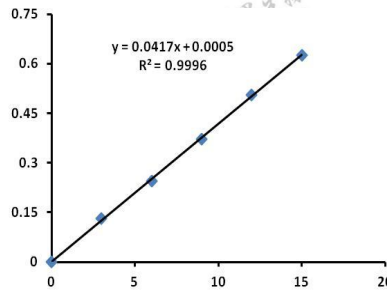
④ 在 EP 管中依次加入：

上清液	150	150
试剂四	200	200
混匀，95-100°C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， $\Delta A=A$ 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 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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质外切酶}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.23] \div (V1 \div V \times W) \div T \\ &= 445.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div W \end{aligned}$$

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 1μgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{几丁质外切酶}(\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.23] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 445.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div Cpr \end{aligned}$$

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。