

## 几丁质酶（Chitinase）试剂盒说明书

微量法 100T/48S

**注意：**正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

### 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 DNS 试剂反应产生棕红色化合物，在 540nm 处有特征吸收峰，吸光值增加速率反映了几丁质酶的活性。

### 自备实验用品及仪器：

天平、水浴锅、离心机、酶标仪、96 孔板、蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 120mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 6mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 15mL×1 瓶，4℃避光保存。

### 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℃离心 20min，取上清，置冰上待测。
2. 真菌：按照细胞数量（10<sup>4</sup> 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℃，离心 20min，取上清置于冰上待测。
3. 培养液：直接测定。

### 测定操作表：

	对照管	测定管
粗酶液（μL）	100	100
提取液（μL）	150	50
试剂一（μL）		100
混匀，37℃水浴 1h。沸水浴 5min 终止反应，冷却后 8000rpm，4℃，离心 10min，取上清，蒸馏水稀释 10 倍待用		
上清	175	175
试剂二（μL）	125	125
混匀，95℃水浴 5min，室温冷却。吸取 200μL 至 96 孔板，测定 540nm 下吸光值 A 测定与 A 对照， $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ 。		

### 计算公式：

标准条件下测定回归方程为  $y = 3.2054x - 0.2753$ ， $R^2 = 0.9984$ ；x 为标准品浓度（mg/mL），y 为吸光值。

#### 1、按照样本重量计算

酶活性定义：37℃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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.2753) \div 3.2054 \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times 10 \\ &= 7.799 \times (\Delta A + 0.2753) \div W \end{aligned}$$

#### 2、按照蛋白质浓度计算

订购电话：0512-62956165    技术支持：18015581827    投诉电话：18112525205

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

$$\begin{aligned}\text{几丁质酶活性 (mg/h mg prot)} &= (\Delta A + 0.2753) \div 3.2054 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10 \\ &= 7.799 \times (\Delta A + 0.2753) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

### 3、按细胞数量计算

酶活定义：37°C条件下，每 10<sup>4</sup>个细胞每小时分解几丁质产生 1mgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{几丁质酶活性 (mg/h /10}^4\text{ cell)} &= (\Delta A + 0.2753) \div 3.2054 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 10 \\ &= 7.799 \times (\Delta A + 0.2753) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

### 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。

$$\begin{aligned}\text{几丁质酶活性 (mg/h /mL)} &= (\Delta A + 0.2753) \div 3.2054 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 10 \\ &= 7.799 \times (\Delta A + 0.2753)\end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，0.25mL；V 样：反应体系中样本体积，0.1mL；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；10，稀释倍数。

### 注意事项：

- 1、如果吸光值超过 2，说明样本中还原糖含量较高，需要额外稀释，并在最后结果中乘以相应倍数。