

上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0432

Size: 100T/48S

## 几丁质酶检测试剂盒说明书

### 微量法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 一、测定意义：

几丁质酶要存在于虾、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。

#### 二、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 3,5-二硝基水杨酸产生棕红色化合物，在540nm 处有特征吸收峰，吸收值增加速率反映了几丁质酶的活性。

#### 三、需自备的仪器和用品：

天平、水浴锅、离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、蒸馏水。

#### 四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 瓶	4℃保存	5mg N-乙酰氨基葡萄糖，临用前加入 2.27mL 蒸馏水配成 10 μmol/mL 的标准溶液。

## 五、操作步骤：

### ● 粗酶液提取

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°C 离心 20min, 取上清, 置冰上待测。

真菌：按照细胞数量 ( $10^4$  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 3s, 间隔 7s, 总时间 3min) 然后 10000g, 4°C, 离心 20min, 取上清置于冰上待检。

培养液：直接测定。

### ● 测定操作表

1. 可见分光光度计/酶标仪预热 30min。波长调至 540nm, 蒸馏水调零。
2. 将标准溶液稀释为 5、4、3、2、1  $\mu\text{mol/mL}$  的标准溶液备用。
3. 在 EP 管中分别加入：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
样品 ( $\mu\text{L}$ )	100	100	-	-
标准溶液 ( $\mu\text{L}$ )	-	-	100	-
蒸馏水 ( $\mu\text{L}$ )	-	-	-	100
试剂一 ( $\mu\text{L}$ )	100	-	100	100
混匀, 37°C 水浴 1h, 沸水浴 5min。				
试剂一 ( $\mu\text{L}$ )	-	100	-	-
8000rpm 常温离心 10min, 分别取上清液 160 $\mu\text{L}$ 于新的 EP 管中, 再加入下列试剂				
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )	40	40	40	40
混匀, 沸水浴反应 10min, 立即置于冰上至室温。于微量玻璃比色皿或 96 孔板中测定每管在 540nm 下的吸光度, 记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算 $\Delta A$ 测定 = A 测定管 - A 对照管, $\Delta A$ 标准 = A 标准管 - A 空白管。				

## 六、计算公式

### 1. 标准曲线的绘制:

以  $\Delta A$  标准为  $y$  轴, 标准溶液浓度为  $x$  轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程  $y=kx+b$ 。将  $\Delta A$  测定带入标准方程中, 得到  $x$  ( $\mu\text{mol/mL}$ )

### 2. 几丁质酶活的计算:

#### (1) 按照样本重量计算

酶活性定义:  $37^{\circ}\text{C}$ 下, 每  $\text{g}$  组织每小时分解几丁质产生  $1\ \mu\text{mol}$   $\text{N}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活性 ( $\text{U/g}$  鲜重)  $=x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = x \div W$ 。

#### (2) 按照蛋白质浓度计算

酶活性定义:  $37^{\circ}\text{C}$ 下, 每  $\text{mg}$  蛋白每小时分解几丁质产生  $1\ \mu\text{mol}$   $\text{N}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活性 ( $\text{U/mg prot}$ )  $=x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = x \div C_{\text{pr}}$ 。

#### (3) 按照细胞数量计算

酶活性定义:  $37^{\circ}\text{C}$ 下, 每  $10^4$  个细胞每小时分解几丁质产生  $1\ \mu\text{mol}$   $\text{N}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活性 ( $\text{U}/10^4\ \text{cell}$ )  $=x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = x \div \text{细胞数量}$ 。

#### (4) 按照培养液体积计算

酶活性定义:  $37^{\circ}\text{C}$ 下, 每  $\text{mL}$  培养液每小时分解几丁质产生  $1\ \mu\text{mol}$   $\text{N}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活性 ( $\text{U/mL}$ )  $=x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = x$ 。

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；T：反应时间，1h；细胞数量：以万计。

#### 七、注意事项：

- (1) 反应结束后尽快进行比色。
- (2) OD 值大于 1.5，样品适当稀释再测定，注意计算公式里乘以稀释倍数；或者缩短 37°C 水浴时间到 X 小时（如 0.5 小时）按照原先计算公式得到的结果再除以 X。