

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-S0557

Size: 100T/48S

土壤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。

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、震荡仪、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板，甲苯、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
缓冲液	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	使用前摇匀
试剂二	液体 10mL×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：

● 样品处理

新鲜土样风干，过 40 目筛。

● 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
土样(g)	0.02	0.02	-	-
甲苯 (μL)	10	10	-	-
缓冲液 (μL)	120	40	-	-
试剂一 (μL)	-	80	-	-
混匀，37°C 震荡培养 1h，8000rpm，4°C，离心 10min，取上清 100 μL ，再加入下列试剂				
蒸馏水 (μL)	-	-	-	100
上清液 (μL)	100	100		
标准溶液 (μL)		-	100	
试剂二	40	40	40	40
蒸馏水	100	100	100	100
混匀，沸水浴 10min，立即置于冰上至室温。取 200 μL 于微量石英比色皿/96 孔板中，测定 540nm 处吸光值，记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算 ΔA 测定 = A 测定管 - A 对照管， ΔA 标准 = A 标准管 - A 空白管。				

六、计算公式

标准曲线的建立：以浓度 (y) 为纵坐标， ΔA 标准 (x) 为横坐标建立标准曲线。

以 ΔA 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 ΔA 测定带入标准方程中，得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)

酶活性定义：37°C条件下，每克土壤每天分解几丁质产生 $1\ \mu\text{mol}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活力 (U /g 土样) = $y \times V_{\text{反总}} \div W \div T = 3.12 \times y \div W$

T: 反应时间, 1/24d; V 反总: 反应体系总体积: 0.13mL; W: 样品质量, 0.02g。