

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-S0710

Size: 50T/24S

几丁质酶检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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、可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、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 80mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	使用前摇匀
试剂二	液体 15mL×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 0.15g 组织，加入1.5mL 提取液) 进行冰浴匀浆，然后 10000pm, 4℃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 750 万细胞加入 1.5mL 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12000rpm, 4℃, 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. 可见分光光度计预热 30min。波长调至 540nm, 蒸馏水调零。
2. 将标准溶液稀释为 4、3、2.5、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 (mL)	0.5	0.5	—	—
标准溶液 (mL)	—	—	0.5	—
蒸馏水 (mL)	—	—	—	0.5
试剂一 (mL)	0.5	—	0.5	0.5
混匀，37℃水浴 1h，沸水浴 5min。				
试剂一 (mL)	—	0.5	—	—
8000rpm 常温离心 10min，分别取上清液 0.8mL 于新的 EP 管中。				
试剂二 (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2
混匀，沸水浴反应 10min，立即置于冰上至室温。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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。				

六、计算公式

1、标准曲线的绘制：

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 ($\mu\text{mol/mL}$)

2、几丁质酶活的计算：

(1) 按照样本重量计算

酶活性定义：37°C 下，每 g 组织每小时分解几丁质产生 1 μmol 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 (U/g 鲜重) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 1.5 \times x \div W$ 。

(2) 按照蛋白质浓度计算

酶活性定义：37°C 下，每毫克蛋白每小时分解几丁质产生 1 μmol 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 (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°C 下，每 10^4 个细胞每小时分解几丁质产生 1 μmol 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 (U/ 10^4cell) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 1.5 \times x \div \text{细胞数量}$ 。

(4) 按照培养液体积计算

酶活性定义：37°C 下，每毫升培养液每小时分解几丁质产生 1 μmol 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 (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，0.5mL；V 样总：加入提取液体积，1.5mL；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 10^4 为单位，万个。

七、注意事项：

1. 反应结束后尽快进行比色。
2. 吸光值大于 1.5 时，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。