

## 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，进一步与对二甲氨基苯甲醛产生红色化合物，在585nm处有特征吸收峰，吸光值增加速率反映了几丁质酶的活性。

### 自备仪器和样品：

天平、水浴锅、离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、甲苯（土壤样品专用）和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体105mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体5mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：液体5mL×1瓶，4°C保存。（若出现结晶，可80°C左右加热溶解后使用）

试剂三：液体5mL×1瓶，4°C保存。

试剂四：液体10mL×1瓶，4°C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°C离心20min，取上清，置冰上待测。
2. 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3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后10000g，4°C，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（ $\mu$ L）	80	80
提取液（ $\mu$ L）	120	40
试剂一（ $\mu$ L）		80
混匀，37°C水浴1h		

试剂二 (μL)	40	40
混匀, 沸水浴7min, 5000rpm, 4°C, 离心10min, 取上清200μL。		
试剂三 (μL)	40	40
试剂四 (μL)	80	80
混匀, 37°C, 15min, 于微量石英比色皿/96孔板, 测定A <sub>585</sub> , ΔA=A测定-A对照。		

### 几丁质酶 (Chitinase) 试剂盒说明书 计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线:  $y=0.3088x-0.003$ ,  $R^2=0.9995$

计算公式:

按照样本重量计算

酶活性定义: 37°C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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h/g鲜重)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 8.096 \times (\Delta A + 0.003) \div W \end{aligned}$$

按照蛋白质浓度计算

酶活定义: 37°C条件下, 每毫克蛋白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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h mg prot)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 8.096 \times (\Delta A + 0.003) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h /10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \\ &= 8.096 \times (\Delta A + 0.003) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

$$\text{几丁质酶活性 (mg/h /mL)} = (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 8.096 \times (\Delta A + 0.003)$$

V反总: 反应体系总体积, 1mL; V样: 反应体系中样本体积, 0.4mL; 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

b. 用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线:  $y=0.1544x-0.003$ ,  $R^2=0.9995$

计算公式:

按照样本重量计算

酶活性定义：37°C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。

$$\begin{aligned}\text{几丁质酶活性 (mg/h/g鲜重)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.1544 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 16.192 \times (\Delta A + 0.003) \div W\end{aligned}$$

按照蛋白质浓度计算

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。

$$\begin{aligned}\text{几丁质酶活性 (mg/h mg prot)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 16.192 \times (\Delta A + 0.003) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{几丁质酶活性 (mg/h /10}^4\text{ cell)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \\ &= 16.192 \times (\Delta A + 0.003) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

#### 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。

$$\text{几丁质酶活性 (mg/h /mL)} = (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 16.192 \times (\Delta A + 0.003)$$

V反总：反应体系总体积，1mL；V样：反应体系中样本体积，0.4mL；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

注意事项：

- 1、反应结束后立即进行比色。
- 2、试剂四有一定的毒性，请操作时做好防护措施。