

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。

自备实验用品及仪器

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℃保存。

试剂一：液体 5mL×1 瓶，4℃保存。

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

试剂三：液体 5mL×1 瓶，4℃保存。

试剂四：液体 10mL×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（10⁴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 ）	80	80
提取液（ μL ）	120	40
试剂一（ μL ）		80
混匀，37℃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 ₅₈₅ ，ΔA=A 测定-A 对照。		

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:

1、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。

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

2、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。

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

3、按细胞数量计算

酶活定义: 37°C条件下, 每 10⁴ 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:

4、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。

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

5、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。

$$\text{几丁质酶活性 (mg/h mg prot)} = (\Delta A + 0.003) \div 0.1544 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 16.192 \times (\Delta A + 0.003) \div \text{Cpr}$$

6、按细胞数量计算

酶活定义：37℃条件下，每 10^4 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℃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。