

外切几丁质酶试剂盒说明书

(分光法 24 样)

一、产品简介：

多种微生物、动物、植物等都可产生几丁质酶，高等植物本身不存在作为真菌细胞壁组分之一的几丁质，但当植物受到病原菌感染时，几丁质酶活性迅速提高。因此该酶与植物对病原微生物的抗性有关，是重要的病程相关蛋白。

根据几丁质酶对底物作用位置的不同，将其分为内切、外切几丁质酶，研究发现几丁质酶多为内切几丁质酶。外切几丁质酶作用于几丁质后，生成 N-乙酰氨基葡萄糖单体，进一步与铁氰化钾反应，于 420nm 处检测，进而计算得到几丁质外切酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 7mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 2.5mL 盐酸充分混匀溶解后，再加 2.8mL 蒸馏水混匀备用。
试剂三	液体 14mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉体 g×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 30mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉剂×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、天平、水浴锅、低温离心机、盐酸。

四、外切几丁质酶活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，于 4℃，12000rpm 离心 10min，取上清置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照提取液体积(mL)：组织质量 (g) 为 1：5~10 的比例进行提取

② 真菌样本：

先收集细胞到离心管内，离心后弃上清；取 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）；于 4℃，12000rpm 离心 10min，取上清置于冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照提取液 (mL)：细细胞数量 (10^4) 为 1：500~1000 的比例进行提取

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 420nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	120	
煮沸的样本		120

试剂一	80	80
试剂二	100	100
混匀, 37℃ (恒温培养箱) 孵育 1.5h 后, 4000rpm 离心 5min, 取上清		

③ 在 EP 管中依次加入:

上清液	200	200
试剂三	270	270
混匀, 4000rpm 离心 5min, 取上清液待测		

④ 在 EP 管中依次加入:

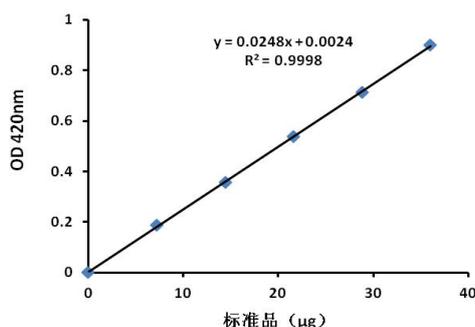
上清液	360	360
试剂四	480	480
混匀, 95-100℃煮沸 8min, 取全部液体至 1mL 比色皿中于 420nm 处读取各管吸光值 A, $\Delta A = A$ 对照 - A 测定(每个样本做一个自身对照)。		

【注】1. 煮沸的样本: 于 95-100℃煮沸 10min, 使样本里面的酶失去活性。

2. 若 ΔA 较小, 可以加大样本量 (如增至 140 μ L, 则试剂一相应减少), 或增加样本取样量 (如 0.2g), 则改变后的 V1 和样本 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0248x + 0.0024$, X 是标准品质量 (μ g), y 是 ΔA 。



2、按照样本重量计算

酶活定义: 每克组织每小时分解几丁质产生 1 μ gN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{外切几丁质酶活性 } (\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0024) \div 0.0248 \times 1.96] \div (V1 \div V \times W) \div T \\ &= 439.1 \times (\Delta A - 0.0024) \div W \end{aligned}$$

3、按照蛋白质浓度计算

酶活定义: 每毫克蛋白每小时分解几丁质产生 1 μ gN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{外切几丁质酶活性 } (\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0024) \div 0.0248 \times 1.96] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 439.1 \times (\Delta A - 0.0024) \div Cpr \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算

酶活定义: 每 10⁴ 个细胞每小时分解几丁质产生 1 μ gN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{外切几丁质酶活性 } (\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0024) \div 0.0248 \times 1.96] \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \\ &= 439.1 \times (\Delta A - 0.0024) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1mL; V1---样本体积, 0.12mL; T---反应时间, 1.5h;

1.96--体积系数; W---样本质量, g; 标准品分子量---221.21;

Cpr---样本蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

1 制备标准品母液 (1mg/mL): 标准品临用前加 2mL 蒸馏水, 即为 1mg/mL。

2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/mL。也可根据

实际样本来调整标准品浓度。

- 3 依据第④步骤的加样体系：360 μ L 标准品+480 μ L 试剂六，混匀，95-100 $^{\circ}$ C煮沸 10min，取全部液体至 1mL 比色皿中于 420nm 处读取各管吸光值 A，标准品的质量作为横坐标，0 mg/mL 对应的 A 值减去各浓度标准品对应的 A 之差作为纵坐标，即可得出标准曲线。