

## 内切几丁质酶试剂盒说明书

(微板法 48 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。内切几丁质酶（Endochitinases）主要水解几丁质多聚体中 $\beta$ -1,4-糖苷键，在蜗牛酶的作用下全部水解为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，进而计算得到内切几丁质酶活性大小。

### 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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 15mL×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 5mL 盐酸充分混匀溶解后，再加 5.5mL 蒸馏水混匀备用。
试剂三	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 2mL×1 支	4℃ 保存	
试剂五	液体 5mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂六	粉体 g×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 24mL 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:

酶标仪、96孔板、天平、水浴锅、低温离心机、盐酸、蒸馏水。

### 四、内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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 420nm。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	80	
煮沸样本		80
试剂一	80	80
试剂二	100	100
混匀, 37°C (恒温培养箱) 孵育 1.5h, 4000rpm 离心 5min, 取上清		

③ 在 EP 管中依次加入:

上清液	150	150
试剂三	10	10
试剂四	15	15
混匀, 37°C 孵育 1h		
试剂五	50	50
混匀, 4000rpm 离心 5min, 取上清液待测,		

④ 在 EP 管中依次加入:

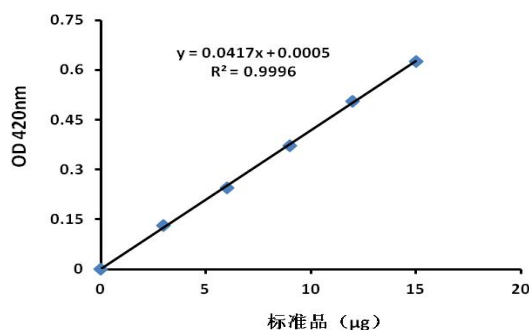
上清液	150	150
试剂六	200	200
混匀, 95-100°C 煮沸 10min, 取 200μL 至 96 孔板中于 420nm 处读取各管吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

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

2. 若  $\Delta A$  较小, 可以加大样本量 (如增至 120μL, 则试剂一相应减少), 或增加样本取样量 (如增至 0.2g), 则改变后的 V1 和样本质量 W 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程:  $y = 0.0417x + 0.0005$ , X 是标准品质量 (μg), y 是  $\Delta A$ 。



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 1μgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{内切几丁质酶活性 } (\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.6] \div (V1 \div V \times W) \div T \\ &= 519.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div W \end{aligned}$$

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 1μgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{内切几丁质酶活性 } (\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.6] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 519.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div Cpr \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算

酶活定义: 每 10<sup>4</sup> 个细胞每小时分解几丁质产生 1μgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{内切几丁质酶活性 } (\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.6] \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \\ &= 519.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

V--提取液体积, 1mL; V1--样本体积, 0.08mL; T--反应时间, 1.5h;

W---样本质量, g; 2.6--体积系数; 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: 150 $\mu$ L 标准品+200 $\mu$ L 试剂六, 混匀, 95-100 $^{\circ}$ C煮沸 10min, 取 200 $\mu$ L 至 96 孔板中于 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。