

外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。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 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	液体 5mL×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 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、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 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	
煮沸的样本		80

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	175	175
试剂三	50	50
混匀，4000rpm 离心 5min，取上清液待测		

④ 在 EP 管中依次加入：

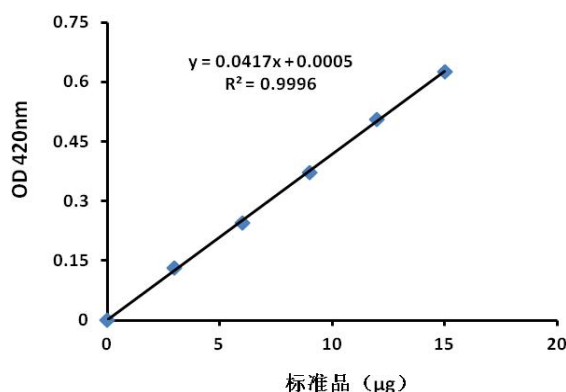
上清液	150	150
试剂四	200	200
混匀，95-100℃煮沸 8min，取 200μL 至 96 孔板中于 420nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1. 煮沸的样本：于 95-100℃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 120μL，则试剂一相应减少），或增加样本取样量（如至 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 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 1μgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{外切几丁质酶活性 (}\mu\text{g/h/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.23] \div (V1 \div V \times W) \div T \\ &= 445.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{外切几丁质酶活性 (}\mu\text{g/h/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.23] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 445.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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 1μgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\begin{aligned} \text{外切几丁质酶活性 (}\mu\text{g/h/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.23] \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \\ &= 445.6 \times (\Delta A - 0.0005) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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； 2.23--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 μ L 标准品+200 μ L 试剂六，混匀，95-100 $^{\circ}$ C煮沸 8min，取 200 μ 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。