

## 几丁质酶（Chitinase）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

**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、1 mL 玻璃比色皿，蒸馏水。

**试剂组成和配制：**

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 10mL×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 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：液体 20mL×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（ $10^4$  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℃，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（ $\mu\text{L}$ ）	400	400
提取液（ $\mu\text{L}$ ）	600	200
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）		400
混匀，37℃ 水浴 1h		
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）	200	200
混匀，沸水浴 7min，5000rpm，4℃，离心 10min，取上清 1000 $\mu\text{L}$ 。		

试剂三 (μL)	200	200
试剂四 (μL)	400	400
混匀, 37°C, 15min, 蒸馏水调零, 1mL 玻璃比色皿, 测定 A <sub>585</sub> , ΔA=A 测定-A 对照。		

**计算公式:**

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

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。

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

3、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

**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。