

# 几丁质外切酶试剂盒

(微板法 48 样)

## 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。

几丁质酶主要水解几丁质多聚体中 $\beta$ -1,4-糖苷键。依据水解位置的不同可分为几丁质内切酶和几丁质外切酶，几丁质外切酶作用于几丁质后，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。

## 试剂盒组成和配制:

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
-----	-------	------	---------------

## 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。

## 几丁质外切酶活性测定：

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°C (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:

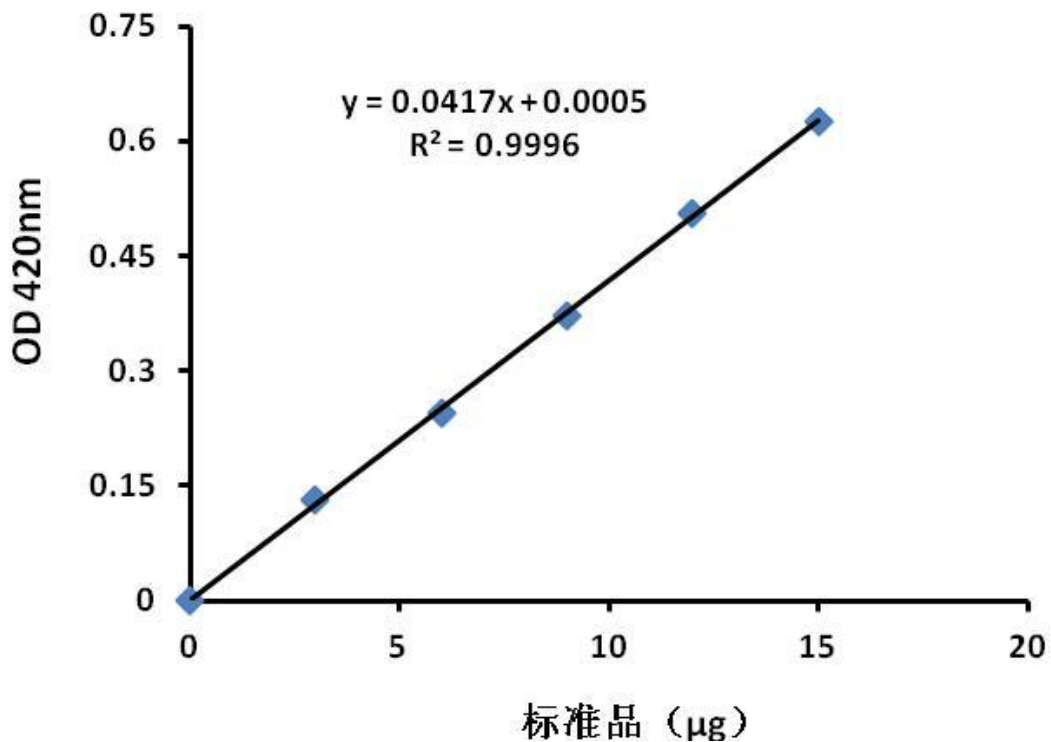
上清液	150	150
试剂四	200	200
混匀, 95-100°C 煮沸 8min, 取 200μL 至 96 孔板中于 420nm 处取各管吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

**【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 (如至 0.2g), 则改变后的 V1 和样本质量 W 需代入公式重新计算。

## 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：

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。

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

## 3、按照蛋白质浓度计算：

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。

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

## 4、按细胞数量计算：

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。

$$\text{几丁质外切酶}(\mu\text{g}/\text{h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0005) \div 0.0417 \times 2.23] \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) = 445.6$$

$\times(\Delta A - 0.0005) \div \text{细胞数量}$

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。
- 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 8min, 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。