

几丁质酶活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10203

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 8mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 9 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 3mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四 A	粉剂×2 瓶	2-8°C保存
试剂四 B	液体 50mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

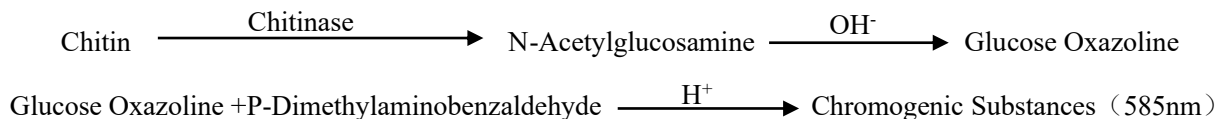
溶液的配制：

- 1、试剂二：此试剂为悬浊液，使用前需摇匀；
- 2、试剂三：此试剂为饱和溶液，低温（2-8°C）条件取出会有晶体析出，60°C加热使其溶解即可；
- 3、试剂四：临用前取一瓶试剂四 A，加入 21mL 试剂四 B 中，充分溶解，现用现配。用不完的试剂 2-8°C 可以保存 4 周（试剂四 B 若有结晶可 37°C 促进溶解）；
- 4、标准品：5mg N-乙酰氨基葡萄糖。临用前加入 1mL 试剂一配制成 5mg/mL 的标准溶液，即 5000µg/mL 的标准溶液，2-8°C 可以保存 4 周。

产品说明：

几丁质酶主要存在于虾、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。

几丁质酶水解几丁质产生 N-乙酰氨基葡萄糖，N-乙酰氨基葡萄糖与碱共热产生的中间化合物可进一步与对二甲氨基苯甲醛反应产生显色物质，该显色物质在 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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液枪、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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。10000g 4℃离心 20min，取上清，置冰上待测。

2、细菌或细胞：收集细菌或细胞到离心管内，弃上清，按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），10000g，4℃离心 20min，取上清，置冰上待测。

3、液体：直接测定（若溶液呈现浑浊，则离心取上清后再测定）。

二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长到585nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、标准溶液的制备：将标准品用试剂一分别稀释为 125、62.5、31.25、15.625、7.8125、3.9、1.953、0.976、0.488μg/mL 的标准溶液。

3、标准液稀释表

序号	稀释前浓度（μg/mL）	标准液体积（μL）	试剂一体积（μL）	稀释后浓度（μg/mL）
1	5000	30	120	1000
2	1000	20	140	125
3	125	100	100	62.5
4	62.5	100	100	31.25
5	31.25	100	100	15.625
6	15.625	100	100	7.8125
7	7.8125	100	100	3.9
8	3.9	100	100	1.953
9	1.953	100	100	0.976
10	0.976	100	100	0.488

实验中每个标准管需100μL标准溶液。

4、操作表:

试剂名称（μL）	对照管	测定管	空白管	标准管
样本	80	80	-	-
试剂一	40	40	-	-
试剂二	80	80	-	-
	37℃酶促反应 1 小时，沸水浴 5min。10000rpm 常温离心 5min 后取上清液		-	-
上清液	100	100	-	-
试剂一	-	-	100	-
标准液	-	-	-	100
试剂三	20	20	20	20
	混匀，常温静置 5min		混匀，沸水浴 5min，流水冷却至常温	
试剂四	300	300	300	300

混匀，37℃孵育 20min，吸取 200μL 于微量玻璃比色皿/96 孔板中测定 585nm 处吸光值，分别记为 A 对照、A 测定、A 空白、A 标准。计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。（标准曲线和空白管只需测 1-2 次即可）

三、几丁质酶活性计算

1. 标准曲线的绘制:

根据标准管的浓度 (x , $\mu\text{g/mL}$) 和吸光度 ΔA 标准 (y , ΔA 标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA 代入方程得到 x ($\mu\text{g/mL}$)。

2. 几丁质酶活计算

(1) 按照样本质量计算

酶活性定义: 37°C 下, 每g组织每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{g}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活性 (U/g 质量) = $x \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 2.5 \times x \div W$

(2) 按照蛋白质浓度计算

酶活性定义: 37°C 下, 每mg蛋白每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{g}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活性 (U/mg prot) = $x \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 2.5 \times x \div C_{\text{pr}}$

(3) 按照细胞数量计算

酶活性定义: 37°C 下, 每 10^4 个细胞每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{g}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活性 (U/ 10^4 cell) = $x \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T = 2.5 \times x \div N$

(4) 按照液体体积计算

酶活性定义: 37°C 下, 每mL液体每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{g}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活性 (U/mL) = $x \times V_{\text{酶促}} \div V_{\text{样}} \div T = 2.5 \times x$

$V_{\text{酶促}}$: 酶促反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.08mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL;

W : 样本质量, g; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; T : 反应时间, 1h; N : 细胞数量, 以 10^4 为单位, 万个。

注意事项:

- 1、反应结束后尽快进行比色。
- 2、吸光值大于1.5或者 ΔA 大于1时, 样本用提取液适当稀释再测定或者缩短 37°C 酶促反应时间, 注意同步修改计算公式。若 ΔA 小于0.01时, 可以延长第一步 37°C 反应时间或者加大样本的加入量, 注意修改计算公式。

实验实例:

- 1、取0.111g 虾壳加入1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 用96孔板测定吸光度并计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.531 - 0.054 = 0.477$, 带入标曲 $y = 0.007x + 0.0205$, 得出 $x = 65.214 \mu\text{g/mL}$, 按样本质量计算酶活得: 几丁质酶活性 (U/g 质量) = $2.5 \times x \div W = 1468.790 \text{ U/g 质量}$ 。
- 2、取0.113g 平菇加入1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 用96孔板测定吸光度并计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.754 - 0.055 = 0.699$, 带入标曲 $y = 0.007x + 0.0205$, 得出 $x = 96.929 \mu\text{g/mL}$, 按样本质量计算酶活得: 几丁质酶活性 (U/g 质量) = $2.5 \times x \div W = 2144.437 \text{ U/g 质量}$ 。

相关系列产品:

- AC10111/AC10112 还原糖含量检测试剂盒
- AC10473/AC10474 酸性木聚糖酶 (ACX) 活性检测试剂盒
- AC10463/AC10464 α -葡萄糖苷酶 (α -GC) 活性检测试剂盒
- AC10475/AC10476 β -木糖苷酶活性检测试剂盒