

## 几丁质酶活性检测试剂盒说明书

### Chitinase Assay Kit

分光光度法

货号: AK110

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES17	100ml×1 瓶	4℃保存
AK110-A	20ml×1 瓶	4℃保存
AK110-B	10ml×1 瓶	4℃保存
AK110-C	10ml×1 瓶	4℃保存
AK110-D	20ml×1 瓶	4℃避光保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

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 (Chitinase, 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。

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。

自备用品:

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

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。

检测步骤:

试剂名称	对照管 (ul)	对照管 (ul)
粗酶液	400	400
提取液 ES17	600	200
AK110-A		400
混匀, 37℃水浴 1h, 5000rpm, 4℃, 离心 10min, 取上清。		
AK110-B	200	200
混匀, 沸水浴 7min		
AK110-C	200	200
AK110-D	200	400
混匀, 37℃, 15min, 对照管调零, 1mL 玻璃比色皿, 测定 A585		

计算公式:

标准曲线:  $y=2.3575x-0.0143$ ,  $R^2=0.9989$

1. 按照样本重量计算

酶活性定义: 37℃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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h/g)} &= (A585 + 0.0143) \div 2.3575 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 1.91 \times (A585 + 0.0143) \div W \end{aligned}$$

2. 按照蛋白质浓度计算

酶活定义: 37℃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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h mg prot)} &= (A585 + 0.0143) / 2.3575 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \\ &= 1.91 \times (A585 + 0.0143) \div Cpr \end{aligned}$$

3. 按细胞数量计算

酶活定义: 37℃条件下, 每  $10^4$  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。

$$\begin{aligned} \text{细胞几丁质酶活性 (mg/h / } 10^4 \text{ cell)} &= (A585 + 0.0143) / 2.3575 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \\ &= 1.91 \times (A585 + 0.0143) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按液体体积计算

酶活定义: 37℃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。

$$\text{几丁质酶活性 (mg/h / mL)} = (A585 + 0.0143) \div 2.3575 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 1.9 \times (A585 + 0.0143)$$

注:  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 1.8mL;  $V_{\text{样}}$ : 反应体系中样本体积, 0.4mL;  $V_{\text{样总}}$ : 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. OD 值大于 0.8, 样品适当稀释再测定, 注意计算公式里乘以稀释倍数; 或者缩短 37℃ 水浴时间到  $x$  小时 (如 0.5 小时), 按照原先计算公式得到的结果再除以  $x$ 。
3. AK110-D 有一定的毒性, 请操作时做好防护措施。