

几丁质酶（Chitinase）试剂盒说明书

微量法100T/48S

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/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、甲苯（土壤样品专用）和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体105mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体5mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体5mL×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5mL×1瓶，4℃保存。

试剂四：液体10mL×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（10⁴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（ μL ）	80	80
提取液（ μL ）	120	40
试剂一（ μL ）		80
混匀，37℃水浴1h		
试剂二（ μL ）	40	40

混匀，沸水浴7min，5000rpm，4℃，离心10min，取上清200μL。		
试剂三（μL）	40	40
试剂四（μL）	80	80
混匀，37℃，15min，于微量石英比色皿/96孔板，测定A585，ΔA=A测定-A对照。		

计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线：y=0.3088-0.003，R2=0.9995

计算公式：

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。

几丁质酶活性 (mg/h/g鲜重) = (ΔA+0.003) ÷ 0.3088 × V反总 ÷ (V样 ÷ V样总 × W) ÷ T

= 8.096 × (ΔA + 0.003) ÷ W

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1mgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

几丁质酶活性 (mg/h mg prot) = (ΔA+0.003) ÷ 0.3088 × V反总 ÷ (V样 × Cpr) ÷ T

= 8.096 × (ΔA + 0.003) ÷ Cpr

按细胞数量计算

酶活定义：37℃条件下，每104个细胞每小时分解几丁质产生1mgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

几丁质酶活性 (mg/h /104 cell) = (ΔA+0.003) ÷ 0.3088 × V反总 ÷ (V样 ÷ V样总 × 细胞数量)

= 8.096 × (ΔA + 0.003) ÷ 细胞数量

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。

几丁质酶活性 (mg/h /mL) = (ΔA+0.003) ÷ 0.3088 × V反总 ÷ V样 = 8.096 × (ΔA + 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

b. 用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线：y=0.1544x-0.003，R2=0.9995

计算公式：

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。

几丁质酶活性 (mg/h/g鲜重) = (ΔA+0.003) ÷ 0.1544 × V反总 ÷ (V样 ÷ V样总 × W) ÷ T

$$=16.192 \times (\Delta A + 0.003) \div W$$

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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h mg prot)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 16.192 \times (\Delta A + 0.003) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

按细胞数量计算

酶活定义：37°C条件下，每104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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h /104 cell)} &= (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \\ &= 16.192 \times (\Delta A + 0.003) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

$$\text{几丁质酶活性 (mg/h /mL)} = (\Delta A + 0.003) \div 0.3088 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 16.192 \times (\Delta A + 0.003)$$

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。