

几丁质外切酶试剂盒说明书

(货号: BP10301F 分光法 24 样 有效期: 3 个月)

一、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 β -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。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 7mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉体 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2.5mL 盐酸充分混匀溶解后, 3. 再加 2.8mL 蒸馏水混匀备用; 4. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉体 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 30mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、所需的仪器和用品:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、盐酸、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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）：细胞数量（ 10^4 ）为 1：500~1000 的比例进行提取

2、上机检测：

- ① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 420nm，蒸馏水调零。

- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	120	
煮沸的样本		120
试剂一	80	80
试剂二	100	100
混匀，37℃（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	200	200
试剂三	270	270
混匀，4000rpm 离心 5min，取上清液待测		

- ④ 在 EP 管中依次加入：

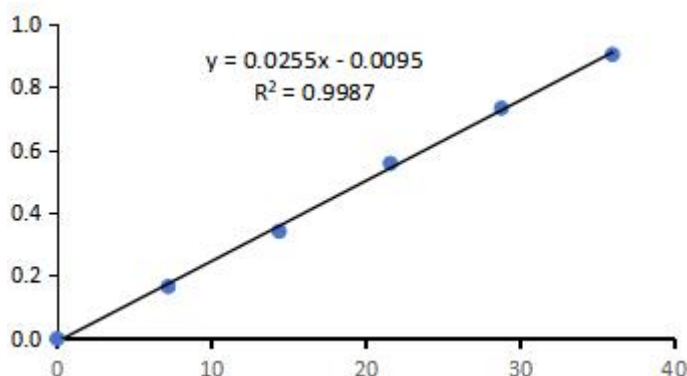
上清液	360	360
试剂四	480	480
混匀，95-100℃煮沸 8min，取全部液体至 1mL 比色皿中于 420nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1. 煮沸的样本：于 95-100℃煮沸 10min，使样本里面的酶失去活性。

2. 若 ΔA 较小，可以加大样本量（如增至 140μL，则试剂一相应减少），或增加样本取样量（如 0.2g），则改变后的 V1 和样本 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.0255x - 0.0095$ ，X 是标准品质量（μg），y 是 ΔA 。



- 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。

$$\text{几丁质外切酶活性}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0095) \div 0.0255 \times 1.96] \div (V1 \div V \times W) \div T \\ = 427 \times (\Delta A + 0.0095) \div W$$

- 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。

$$\text{几丁质外切酶活性}(\mu\text{g/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0095) \div 0.0255 \times 1.96] \div (V1 \times C_{pr}) \div T$$

$$=427 \times (\Delta A + 0.0095) \div \text{Cpr}$$

4、按细胞数量计算：

定义：每 10^4 个细胞每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{gN}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

几丁质外切酶活性 ($\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}$) = $[(\Delta A + 0.0095) \div 0.0255 \times 1.96] \div (V1 \div V \times \text{细胞数量})$

$$=427 \times (\Delta A + 0.0095) \div \text{细胞数量}$$

V---加入提取液体积, 1mL; V1---样本体积, 0.12mL; T---反应时间, 1.5h;

1.96---体积系数; W---样本质量, g; 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 标准品临用前加 2mL 蒸馏水，标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200uL，加入 1800uL 蒸馏水，混匀得到 0.1mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
标品稀释液 uL	0	80	160	240	320	400
水 uL	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	360	
蒸馏水		360
试剂六	480	480
混匀，95-100°C煮沸 10min，取全部液体至 1mL 比色皿中于 420nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		