

几丁质酶 (Chitinase) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

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 DNS 试剂反应产生棕红色化合物,在 540nm 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、分光光度计、1mL 玻璃比色皿、蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 12mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 30mL×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)	400	400
提取液 (μL)	600	200
试剂一 (μL)		400
混匀, 37°C水浴 1h。沸水浴 5min 终止反应, 冷却后 8000rpm, 4°C, 离心 10min, 取上清 蒸馏水稀释 10 倍待用		
上清	700	700
试剂二 (μL)	500	500
混匀, 95°C水浴 5min, 室温冷却。吸取 1000μL 至1mL 玻璃比色皿, 测定 540nm 下吸光值 A 测定与 A 对照, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。		

计算公式:

标准条件下测定回归方程为 $y = 6.4108x - 0.2753$, $R^2 = 0.9984$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

1、按照样本重量计算

酶活性定义: 37°C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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.2753) \div 6.4108 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &\div T \times 10 \\ &= 3.899 \times (\Delta A + 0.2753) \div W \end{aligned}$$

2、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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h mg prot)} &= (\Delta A + 0.2753) \div 6.4108 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10 \\ &= 3.899 \times (\Delta A + 0.2753) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算

酶活定义: 37°C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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h / } 10^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.2753) \div 6.4108 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \times 10 \\ &= 3.899 \times (\Delta A + 0.2753) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h / mL)} &= (\Delta A + 0.2753) \div 6.4108 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 10 \\ &= 3.899 \times (\Delta A + 0.2753) \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1 mL; $V_{\text{样}}$: 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; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; 10, 稀释倍数。

注意事项:

1、 如果吸光值超过 4，说明样本中还原糖含量较高，需要额外稀释，并在最后结果中乘以相应倍数。

