北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www. bjoka- vip. com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

几丁质酶（Chitinase）试剂盒说明书

分光法 24 样

一、产品说明

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，在蜗牛酶的作用下全部水解为N- 乙酰氨基葡萄糖单体，进一步与对二甲氨基苯甲醛产生红色化合物，进而计算得到几丁质酶活性大小。

二、自备实验用品及仪器

天平、水浴锅、离心机、可见分光光度计、 1mL 玻璃比色皿、乙酸、盐酸和蒸馏水。

三、试剂组成和配制

试剂名称	规格	保存温度	配置	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存		
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存		
试剂二	粉剂×2 支	4℃保存	临用前每支加 0.75mL 蒸馏水	现配现用
试剂三	液体 1.5mL×1 瓶	4℃保存		
试剂四	粉剂×2 瓶	4℃保存	临用前每瓶加入 15mL 乙酸溶解，再加 0.188mL 的浓 HCl	现配现用

四、样本制备

建议正式实验前取 2 个样本做预测定，了解本批样本含量情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

①组织样本：称取约0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

②细菌/细胞样本：先收集细菌/细胞到离心管中，离心弃上清；取500 万细菌/细胞加入 1mL 提取液超声破碎细菌/细胞（冰浴，功率20%或 200w，超声3s，间隔10s，重复30 次）12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

③液体样本：直接检测

五、测定操作表

	对照管	测定管
粗酶液（μL）		100
煮沸上清液（μL）	100	
试剂一（μL）	200	200
混匀，37℃水浴 2h。		
试剂二（μL）	30	30
混匀，37℃水浴 30min；离心取上清		
上清液（μL）	200	200
试剂三（μL）	20	20
混匀，95℃ 水浴5min		
试剂四（μL）	600	600
混匀，37℃显色 20min，取全部反应液于 1mL 玻璃比色皿中，测定各管 585nm 处吸光值 A，计算ΔA=A 测定管-A 对照管。		

六、计算公式

标准曲线为：$y = 9.8231x + 0.007$，$R^2 = 0.9995$；x 为标准品浓度（mg/mL），y 为吸光值ΔA。

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。

几丁质酶活性(μg/h/g 鲜重)=(ΔA-0.007)÷9.8231×V 反总÷(V 样÷V 样总×W) ÷T×1000

= 167.97×(ΔA-0.007)÷W

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 1mgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

几丁质酶活性（μg/h /mg prot）=(ΔA-0.007)÷9.8231×V 反总÷(V 样×Cpr) ÷T×1000

= 167.97×(ΔA-0.007)÷Cpr

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 1mgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

几丁质酶活性(μg/h /10^4 cell)=(ΔA-0.007)÷9.8231×V 反总÷(V 样÷V 样总×细胞数量)÷T×1000

= 167.97×(ΔA-0.007)÷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（μg/h /mL）=(ΔA-0.007)÷9.8231×V 反总÷V 样÷T×1000

= 167.97×(ΔA-0.007)

V 反总：反应体系总体积，0.33mL；V 样：反应体系中样本体积，0.1mL；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；1000：单位换算系数；T：反应时间 2h。

