



几丁质外切酶试剂盒

可见分光光度法

货号: R43962-24S

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。

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℃保存	
试剂一	液体7mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	粉体mg×1瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加2.5mL盐酸充分混匀溶解后, 再加2.8mL蒸馏水混匀备用。
试剂三	液体14mL×1瓶	4℃保存	
试剂四	粉体g×1瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加30mL蒸馏水溶解备用。
标准品	粉剂×1支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、天平、水浴锅、低温离心机、盐酸。

几丁质外切酶活性测定:



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): 细细胞数量(10^4)为1:500~1000的比例进行提取

2、上机检测:

①可见分光光度计预热30min 以上，调节波长至420nm, 蒸馏水调零。

②所有试剂解冻至室温(25℃)。

③煮沸样本的制备: 可取至少300μL 待检测样本上清液于95-100℃煮沸10min 后，于室温或4℃×12000rpm 离心10min, 上清液即为对照管的待检液。

④ 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



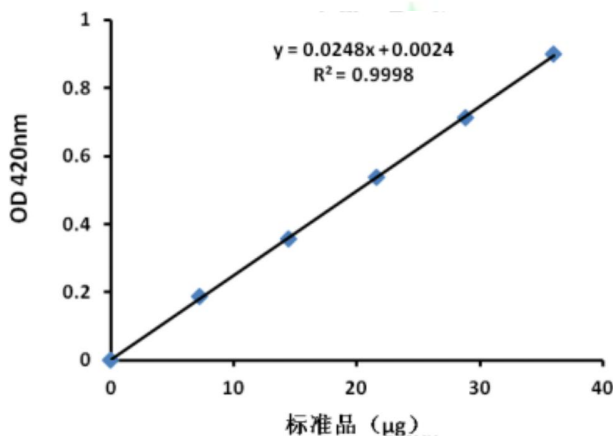
混匀, 4000rpm离心5min,取上清液待测

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(光径1cm)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)。		

结果计算:

1、标准曲线方程: $y=0.0248x+0.0024$; 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 $1\mu\text{g}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\text{几丁质外切酶活性}(\mu\text{g/h/g 鲜重})=[(\Delta A-0.0024)\div 0.0248\times 1.96]\div (V1\div V\times W)\div T$$
$$=439.1\times (\Delta A-0.0024)\div W$$

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 $1\mu\text{g}$ N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个单位。

$$\text{几丁质外切酶活性}(\mu\text{g/h/mg prot})=[(\Delta A-0.0024)\div 0.0248\times 1.96]\div (V1\times Cpr)\div T$$
$$=439.1\times (\Delta A-0.0024)\div Cpr$$

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。

$$\text{几丁质外切酶活性}(\mu\text{g/h}/10^4\text{cell})=[(\Delta A-0.0024)\div 0.0248\times 1.96]\div (V1\div V\times \text{细胞数量})$$
$$=439.1\times (\Delta A-0.0024)\div \text{细胞数量}$$

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---21.21;

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.制备标准品母液(1mg/mL):标准品临用前加2mL蒸馏水, 即为1mg/mL。

2.把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0,0.02,0.04,0.06,0.08,0.1mg/mL。

3.依据第④步骤的加样体系: 360 μL 标准品+480 μL 试剂六, 混匀, 95-100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸10min, 取全部液体至1mL 比色皿(光径1cm) 中于420nm 处读取各管吸光值A, 标准品的质量作为横坐标, 0mg/mL 对应的A 值减去各浓度标准品对应的A 之差作为纵坐标, 即可得出标准曲线。