

土壤几丁质酶检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA1306

产品规格：50管/24样

产品简介：

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(EC3.2.1.14)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。

几丁质酶水解几丁质产生N-乙酰氨基葡萄糖，进一步与3,5-二硝基水杨酸产生棕红色化合物，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。

产品组成：

提取液：液体80mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体40mL×1瓶，4℃保存，使用前摇匀。

试剂二：液体15mL×1瓶，4℃保存。

标准品：粉剂×1瓶。5mgN-乙酰氨基葡萄糖，4℃保存。临用前加入2.27mL蒸馏水配成10μmol/mL的标准溶液。

需自备的仪器和用品：

天平、水浴锅、离心机、可见分光光度计、1mL玻璃比色皿，研钵/匀浆器、蒸馏水。

操作步骤：

一、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0.15g组织，加入1.5mL提取液)进行冰浴匀浆，然后10000rpm, 4℃离心20min, 取上清，置冰上待测。
2. 真菌:按照细胞数量(10^4 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3s，间隔7s，总时间3min) ;然后12000rpm, 4℃离心20min,取上清置于冰上待检。
3. 培养液:直接测定。

二、测定操作表

1. 可见分光光度计预热30min。波长调至540nm，蒸馏水调零。
2. 将标准溶液稀释为4、3、2.5、2、1μmol/mL的标准溶液备用。
3. 在EP管中分别加入：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
样品(mL)	0.5	0.5	-	-
标准溶液(mL)	-	-	0.5	-
蒸馏水(mL)	-	-	-	0.5
试剂一 (mL)	0.5	-	0.5	0.5
混匀，37℃水浴1h，沸水浴5min。				
试剂一 (mL)	-	0.5	-	-
8000rpm，常温离心10min，分别取上清液0.8mL于新的EP管中。				
试剂二 (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2
混匀，沸水浴反应10min，立即置于冰上至室温。测定每管在540nm下的吸光度，记为A测定管、A对照管、A标准管、A空白管。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。				



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

三、计算公式

1、标准曲线的绘制:

以 ΔA 标准为 y 轴, 标准溶液浓度为 x 轴。绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$ 。将 ΔA 测定带入标准方程中, 得到 $x(\mu\text{mol/mL})$

2、几丁质酶活的计算:

(1)按照样本重量计算

酶活性定义: 37°C下, 每 g 组织每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{molN}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活性(U/g 鲜重) $=x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 1.5 \times x \div W$ 。

(2)按照蛋白质浓度计算

酶活性定义: 37°C下, 每毫克蛋白每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{molN}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活性(U/mg prot) $=x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = x \div C_{\text{pr}}$ 。

(3)按照细胞数量计算

酶活性定义: 37°C下, 每 10^4 个细胞每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{molN}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活性($\text{U}/10^4 \text{ cell}$) $=x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 1.5 \times x \div \text{细胞数量}$ 。

(4)按照培养液体积计算

酶活性定义: 37°C下, 每毫升培养液每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{molN}$ -乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活性(U/mL) $=x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = x$ 。

$V_{\text{样}}$:反应体系中样本体积, 0.5mL;

$V_{\text{样总}}$:加入提取液体积, 1.5mL;

W :样本质量, g;

C_{pr} :样本蛋白浓度, mg/mL;

T :反应时间, 1h.

注意事项:

1. 反应结束后尽快进行比色。
2. 吸光值大于 1.5 时, 样品适当稀释再测定, 注意计算公式里乘以稀释倍数; 或者缩短 37°C水浴时间到 X 小时(如 0.5 小时), 按照原先计算公式得到的结果再除以 X。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>