

几丁质酶活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1177

产品规格：100管/48样

产品简介：

几丁质酶要存在于虾、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。

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，吸收值增加速率反映了几丁质酶的活性。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体50mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体5mL×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂一：用前摇匀。
2. 标准品：5mg N-乙酰氨基葡萄糖，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/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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。

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），冰浴超声破碎细胞（功率300w，超声3s，间隔7s，总时间3min）；然后10000g，4℃，离心20min，取上清置于冰上待测。

培养液：直接测定。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min。波长调至540nm，蒸馏水调零。
2. 将标准溶液用蒸馏水稀释为5、4、3、2、1μmol/mL 的标准溶液备用。
3. 在EP管中分别加入：



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

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
样本 (μL)	100	100	-	-
标准溶液 (μL)	-	-	100	-
蒸馏水 (μL)	-	-	-	100
试剂一 (μL)	100	-	100	100
混匀, 37℃水浴1h, 沸水浴5min。				
试剂一 (μL)	-	100	-	-
8000rpm常温离心10min, 分别取上清液160μL于新的EP管中, 再加入下列试剂				
试剂二 (μL)	40	40	40	40
混匀, 沸水浴反应10min, 立即置于冰上至室温。于微量玻璃比色皿或96孔板中测定每管在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ΔA测定=A测定管-A对照管, ΔA标准=A标准管-A空白管。				

三、几丁质酶活的计算

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 (μmol/mL)。

2. 按照样本重量计算

酶活性定义: 37℃下, 每g组织每小时分解几丁质产生1μmol 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 (U/g质量) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = x \div W$

3. 按照蛋白质浓度计算

酶活性定义: 37℃下, 每mg蛋白每小时分解几丁质产生1μmol 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 (U/mg prot) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = x \div C_{\text{pr}}$

4. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 37℃下, 每10⁴个细胞每小时分解几丁质产生1μmol 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 (U/10⁴cell) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = x \div \text{细胞数量}$

5. 按照培养液体积计算

酶活性定义: 37℃下, 每mL培养液每小时分解几丁质产生1μmol 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 (U/mL) = $x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = x$

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; T: 反应时间, 1h; 细胞数量: 以万计。

注意事项:

1. 反应结束后尽快进行比色。
2. OD值大于1.5, 样本适当稀释再测定, 注意计算公式里乘以稀释倍数; 或者缩短37℃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