

几丁质酶活性检测试剂盒说明书

Chitinase Assay Kit

微量法

货号: AK111

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES17	105mlx1 瓶	4℃保存
AK111-A	10mlx1 瓶	4℃保存
AK111-B	5mlx1 瓶	4℃保存
AK111-C	5mlx1 瓶	4℃保存
AK111-D	10mlx1 瓶	4℃避光保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

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 (Chitinase, 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。

原理: 几丁质酶水解几丁质产生 N-乙酰氨基葡萄糖, 进一步与对二甲氨基苯甲醛产生红色化合物, 在 585nm 处有特征吸收峰, 吸光值增加速率反映了几丁质酶的活性。

自备用品:

天平、水浴锅、离心机、可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿、蒸馏水

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 ES17) 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 (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 ES17), 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。

检测步骤:

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)
粗酶液	80	80
提取液 ES17	120	40
AK111-A		80
混匀, 37℃水浴 1h, 5000rpm, 4℃, 离心 10min, 取上清。		
AK111-B	40	40
混匀, 沸水浴 7min		
AK111-C	40	40
AK111-D	80	80
混匀, 37℃, 15min, 于微量石英比色皿/96 孔板, 对照管调零, 测定 A585。		

计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y=2.3575x-0.0143$, $R^2=0.9989$

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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h/g)} &= (A585 + 0.0143) \div 2.3575 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 1.91 \times (A585 + 0.0143) \div W \end{aligned}$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.36mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.08mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; W : 样本质量, g

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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h mg prot)} &= (A585 + 0.0143) \div 2.3575 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 1.91 \times (A585 + 0.0143) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.36mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.08mL; C_{pr} : 蛋白浓度, mg/mL。

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 1mgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{细胞几丁质酶活性 (mg/h/}10^4\text{cell)} &= (A585 + 0.0143) \div 2.3575 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \\ &= 1.91 \times (A585 + 0.0143) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

$$\text{几丁质酶活性 (mg/h /mL)} = (A585 + 0.0143) \div 2.3575 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 1.9 \times (A585 + 0.0143)$$

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y=1.1788x-0.0143$, $R^2=0.9989$

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。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h/g)} &= (A585 + 0.0143) \div 1.1788 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 3.82 \times (A585 + 0.0143) \div W \end{aligned}$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.36mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.08mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; W : 样本质量, g。

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 1mgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{几丁质酶活性 (mg/h mg prot)} &= (A585 + 0.0143) \div 1.1788 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 3.82 \times (A585 + 0.0143) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.36mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.08mL; C_{pr} : 蛋白浓度, mg/mL

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 1mgN-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

细胞几丁质酶活性 (mg/h /10⁴ cell) = (A585+0.0143)÷1.1788×V 反总÷(V 样÷V 样总×细胞数量) = 3.82×(A585+0.0143)÷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 (mg/h /mL) = (A585+0.0143)÷1.1788×V 反总÷V 样 = 3.82×(A585+0.0143)

注意事项：

1. 反应结束后立即进行比色。
2. OD 值大于 0.8，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℃ 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。
3. AK111-D 有一定的毒性，请操作时做好防护措施。