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	60ml×1 瓶	4℃保存
AK111-A	8ml×1 瓶	4℃保存
AK111-B	9ml×1 瓶	4℃保存; 此试剂为悬浊液, 使用前需摇匀
AK111-C	3ml×1 瓶	4℃保存; 饱和溶液, 低温(2-8℃)条件取出会有晶体析出, 60℃加热使其溶解即可;
AK111-D1	粉剂×2 瓶	4℃保存; 临用前取一瓶试剂 D1, 加入 21mL 试剂 D2 中, 充分溶解, 现用现配。用不完的试剂 2-8℃可以保存 4 周(试剂 D2 若有结晶可 37℃促进溶解);
AK111-D2	50ml×1 瓶	
AK111-标准品	粉剂×1 支	4℃保存; 临用前加入 1mL 试剂 A 配制成 5mg/mL 的标准溶液, 即 5000μg/mL 的标准溶液, 4℃可以保存 4 周。

※ 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, N-乙酰氨基葡萄糖与碱共热产生的中间化合物可进一步与对二甲氨基苯甲醛反应产生显色物质, 该显色物质在 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:

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液枪、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

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)进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4℃离心 20min, 取上清, 置冰上待测。
2. 细菌或细胞: 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 200w, 超声 3 秒, 间隔 10 秒, 重复 30 次); 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:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长到 585nm, 蒸馏水调零。
2. 标准溶液的制备: 将标准品用试剂 A 分别稀释为 125、62.5、31.25、15.6、7.8、3.9、1.95μg/mL 的标准溶液。

3. 操作表:

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)	空白管(ul)	标准管(ul)
粗酶液	80	80		
AK111-A	40	40		
AK111-B	80	80		
	37℃酶促反应 1 小时, 沸水浴 5min。 10000rpm 常温离心 5min 后取上清液			
上清液	100	100		
AK111-A			100	
标准液				100
AK111-C	20	20	20	20
	混匀, 常温静置 5min		混匀, 沸水浴 5min (缠封口膜, 防止爆管), 流水冷却至常温	
AK111-D	300	300	300	300
混匀, 37℃孵育 20min, 吸取 200μL 于微量玻璃比色皿/96 孔板中测定 585nm 处吸光值, 分别记为 A 对照、A 测定、A 空白、A 标准。计算 $\Delta A = A \text{ 测定} - A \text{ 对照}$, $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准} - A \text{ 空白}$ 。(标准曲线和空白管只需测 1-2 次即可)				

计算公式:

标准曲线的绘制:

根据标准管的浓度 (x, μg/mL) 和吸光度 $\Delta A \text{ 标准}$ (y, $\Delta A \text{ 标准}$), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA 代入方程得到 x (μg/mL)。

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 1μg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

$$\text{几丁质酶活性 (U/g)} = x \times V \text{ 酶促} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 2.5 \times x \times W$$

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 1μg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

$$\text{几丁质酶活性 (U/mg prot)} = x \times V \text{ 酶促} \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 2.5 \times x \div Cpr$$

3. 按细胞数量计算

酶活定义: 37℃条件下, 每 10⁴ 个细胞每小时分解几丁质产生 1 μg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

$$\text{细胞几丁质酶活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V \text{ 酶促} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times N) \div T = 2.5 \times x \div N$$

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 1μg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

$$\text{几丁质酶活性 (U/mL)} = x \times V \text{ 酶促} \div V \text{ 样} \div T = 2.5 \times x$$

注: V 酶促: 酶促反应体积, 0.2mL; V 样: 加入的样本体积, 0.08mL; 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; N: 细胞数量, 以 10⁴ 为单位, 万个。

注意事项:

1. 反应结束后立即进行比色。
2. 吸光值大于 1.5 或者 ΔA 大于 1 时, 样本用提取液适当稀释再测定或者缩短 37℃酶促反应时间, 注意计算公式修改; 若 ΔA 小于 0.01 时, 可以延长第一步 37℃反应时间或者加大样本的加入量, 注意修改计算公式。