

几丁质酶活性检测试剂盒（可见分光光度法）

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

产品货号：BA1176

产品规格：50管/24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。

产品内容：

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。5mg N-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10000g，4℃离心20min，取上清，置冰上待测。

2、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750万细胞加入1.5mL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（mL）	测定管	对照管	标准管	空白管
样品	0.5	0.5	-	-
标准溶液	-	-	0.5	-
蒸馏水	-	-	-	0.5
试剂一	0.5	-	0.5	0.5
混匀，37℃水浴1h，沸水浴5min。				
试剂一	-	0.5	-	-



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

8000rpm常温离心10min，分别取上清液0.8mL于新的EP管中。				
试剂二	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 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。				

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℃下，每g组织每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{mol}$ 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 鲜重) = $x \times V_{样} \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) \div T = 1.5x \div W$ 。

(2) 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 $1\mu\text{mol}$ 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) = $x \times V_{样} \div (V_{样} \times C_{pr}) \div T = x \div C_{pr}$ 。

(3) 按照细胞数量计算

酶活性定义：37℃下，每 10^4 个细胞每小时分解几丁质产生 $1\mu\text{mol}$ 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/ 10^4 cell) = $x \times V_{样} \div (V_{样} \div V_{样总} \times \text{细胞数量}) \div T = 1.5x \div \text{细胞数量}$ 。

(4) 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 $1\mu\text{mol}$ 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) = $x \times V_{样} \div V_{样} \div T = x$ 。

V样：反应体系中样本体积，0.5mL；V样总：加入提取液体积，1.5mL；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 10^4 为单位，万个。

注意事项：

1、反应结束后尽快进行比色。

2、OD值大于1.5，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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com