

# 几丁质酶检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1188BKM

保存：4℃避光保存 12 个月

规格：48T/24S 96T/48S

适用样本：动植物组织、细胞、细菌、真菌、培养液等液体样本

## 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(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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测生物样本中几丁质酶的活性水平。其原理是几丁质酶水解几丁质产生 N-乙酰氨基葡萄糖，进一步与 DNS 试剂反应产生棕红色化合物，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。

## 产品内容

| 试剂盒组分              | 规格     |        | 储存条件   |
|--------------------|--------|--------|--------|
|                    | 48T    | 96T    |        |
| 提取液                | 60mL   | 120mL  | 4℃保存   |
| 试剂一                | 3mL    | 6mL    | 4℃保存   |
| 试剂二                | 7.5mL  | 15mL   | 4℃避光保存 |
| 标准品（5mg N-乙酰氨基葡萄糖） | 粉剂×1 支 | 粉剂×1 支 | 4℃保存   |

## 自备耗材

酶标仪或可见分光光度计（能测 540nm 处的吸光度）

96 孔板或微量玻璃比色皿，可调节式移液枪及枪头

制冰机，离心机，水浴锅

去离子水

匀浆器

## 试剂准备

提取液：即用型；4℃保存。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。

标准品：5mg N-乙酰氨基葡萄糖，临用前加入 1mL 提取液溶解。配制成 5mg/mL 即 5000 μg/mL 标准储备液备用，5000 μg/mL 标准储备液 4℃可保存 1 周，也可分装-20℃长期保存。取 160μL 5000 μg/mL 标准储备液加入 840μL 提取液得到 800 μg/mL 的标准溶液。

**注意：每次实验，请使用新配制新的标准溶液。**

## 样本制备

组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，10,000g，4℃离心 20min，取上清液，置冰上待测。

细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 10,000g，4℃离心 20min，取上清液，置冰上待测。

培养液等液体样本：直接测定(若溶液呈现浑浊，则离心取上清后再测定)。

## 产品说明书

**注意：**推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存1个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用BCA法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

### 实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热30min以上，调节波长到540nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 操作表（在EP管中）：

|     | 对照管（μL） | 测定管（μL） | 标准管（μL） | 空白管（μL） |
|-----|---------|---------|---------|---------|
| 样本  | 100     | 100     | 0       | 0       |
| 提取液 | 150     | 50      | 0       | 0       |
| 试剂一 | 0       | 100     | 0       | 0       |

混匀，37℃保温1h。沸水浴5min终止反应，冷却后8000rpm，4℃离心10min，取上清，去离子水稀释10倍待用

|          |     |     |     |     |
|----------|-----|-----|-----|-----|
| 稀释后的样本上清 | 175 | 175 | 0   | 0   |
| 标准品      | 0   | 0   | 175 | 0   |
| 提取液      | 0   | 0   | 0   | 175 |
| 试剂二（μL）  | 125 | 125 | 125 | 125 |

混匀，95℃水浴5min，冷却至室温。取200μL转移至微量玻璃比色皿或96孔板中，于540nm处分别读取空白管、标准管、对照管和测定管吸光值，计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

**注意：**空白和标准只需测定1次，每个测定管设一个对照管。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 $A_{\text{测定}}$ 大于2.0，需要将样本用去离子水进一步稀释，计算公式中乘以进一步稀释的倍数。

### 结果计算

#### 几丁质酶活性计算

##### 1. 按样本鲜重计算

酶活性定义：37℃下，每g组织在反应体系中每小时产生1μg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活力(U/g鲜重) =  $C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10 = 20000 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div W$

##### 2. 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：37℃下，每1万个细菌或细胞在反应体系中每小时产生1μg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活力(U/10<sup>4</sup>cells) =  $C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反应}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10 = 40 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}})$

##### 3. 按液体体积计算

单位的定义：37℃下，每mL液体样本在反应体系中每小时产生1μg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活力(U/mL) =  $C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10 = 20000 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}})$

##### 4. 按照蛋白浓度计算

单位的定义：37℃下，每mg组织蛋白在反应体系中每小时产生1μg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

几丁质酶活力(U/mg prot) =  $C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反应}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10 = 20000 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div C_{\text{pr}}$

$C_{\text{标}}$ ：标准溶液浓度，800μg/mL； $V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积，0.25mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； $T$ ：反应时间，1h；10：稀释倍数； $W$ ：样本质量，g； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细菌或细胞总数，500万。

### 注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

## 产品说明书

相关产品：

PMK1164BKM 葡萄糖检测试剂盒（微量法）

PMK1183BKM  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶（ $\beta$ -1,3-GA）检测试剂盒（微量法）

PMK1185BKM  $\beta$ -葡萄糖苷酶（ $\beta$ -GC）/纤维二糖水解酶检测试剂盒（微量法）

PMK1187BKM  $\beta$ -半乳糖苷酶（ $\beta$ -GAL）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

