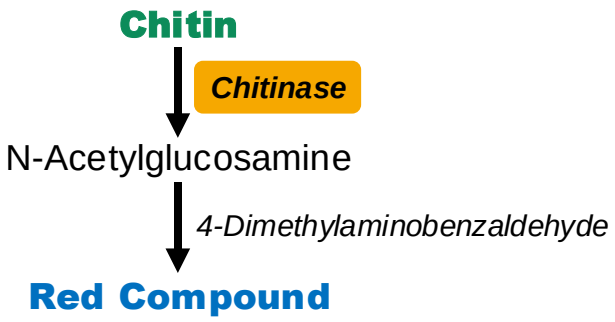
几丁质酶活性检测试剂盒

Chitinase Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

几丁质酶活性检测试剂盒

Chitinase Activity Assay Kit

一、产品描述

几丁质酶是能够催化几丁质中 β-1,4 糖苷键水解为 N-乙酚寡糖和葡萄糖的酶系，主要存在于甲壳类动物的外壳与软体动物的器官、真菌类的细胞壁、以及受侵染的高等植物中，具有降解真菌细胞壁抵御真菌侵染的作用，同时其降解产物氨基糖寡糖素在调节动植物细胞代谢中起着关键作用，在工业生产、农业应用、环境保护和疾病治疗等领域发挥着重要作用。

几丁质酶能够水解几丁质产生 N-乙酰氨基葡萄糖（NAG），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，产物在 585 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征几丁质酶的活性。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液		液体 60 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂一		液体 15 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二		液体 10 mL×1 瓶	4°C保存	**试剂为悬浊状态，混匀后直接使用即可**
试剂三		液体 3 mL×1 瓶	4°C保存	**若有晶体析出属于正常现象** （超声促溶或 50°C加热溶解后使用即可）
试剂四	**组分 A**	粉剂×2 瓶	4°C避光保存	**使用前每瓶组分 A 中加入 2 mL 组分 B** （充分溶解，配制后 4°C可保存 1 个月）
	组分 B	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五		液体 40 mL×1 瓶	4°C保存	-
标准品		粉剂×1 支 （5 mg NAG 标准品）	4°C避光保存	**使用前加入 1 mL 试剂一充分溶解** （即为 5000 μg/mL NAG 标准液）
标准稀释液的制备（现用现配）：使用前将 5000 μg/mL NAG 标准液使用**试剂一**稀释至 100、80、60、40、20、10 μg/mL 即为标准稀释液。				

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 15 min，取上清液置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（10^4 个）：提取液体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4℃ 12000 g 离心 15 min，取上清液置于冰上待测。

③培养液等液体样本：直接测定或适当稀释后再进行测定。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 585 nm。

②**灭活酶液的制备：**吸取适量粗酶液至新离心管中（100-200 μL 即可），沸水浴处理 5 min（密封以防止水分散失），冷却至室温，即为灭活酶液（若浑浊可适当离心后取上清）。

③**试剂四应用液的制备（现用现配）：**使用前根据使用量按试剂四：试剂五=1:9 的体积比配制，充分混匀即为试剂四应用液。

④**标准稀释液的制备（现用现配）：**使用前将 5000 μg/mL NAG 标准液使用**试剂一**稀释至 100、80、60、40、20、10 μg/mL 即为标准稀释液。

序号	A	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度（μg/mL）	5000	1000	100	100	60	40	20
标准液体积（μL）	100	100	400	300	400	200	200
试剂一体积（μL）	400	900	100	200	200	200	200
稀释后浓度（μg/mL）	1000	100	80	60	40	20	10

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

⑤在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管（μL）	对照管（μL）	标准管（μL）	空白管（μL）
粗酶液	80	-	-	-
灭活酶液	-	80	-	-
试剂一	40	40	-	-
试剂二	80	80	-	-
①充分混匀，37℃准确反应 1 h； ②立即沸水浴处理 5 min，冷却至室温； ③12000 g 常温离心 5 min，**取上清液**；				
上清液	100	100	-	-
标准稀释液	-	-	100	-
试剂一	-	-	-	100
试剂三	20	20	20	20
充分混匀，沸水浴处理 5 min，冷却至室温				
试剂四应用液	300	300	300	300
充分混匀，37℃反应 20 min				

注：沸水浴处理过程中注意密封以防止水分散失。

吸光值测定：吸取 200μL 反应液至 96 孔板中，测定 585 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算ΔA 测定=A 测定-A 对照，ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：每个样品均需设一个对照管，各浓度标准管和空白管只需测定 1-2 次，**反应结束后应尽快完成吸光值测定**。

标准曲线的建立：以 100、80、60、40、20、10 μg/mL 标准稀释液浓度为横坐标（x），对应的ΔA 标准为纵坐标（y），绘制标准曲线，得到标准方程 y=kx+b，将ΔA 测定代入方程中得到 x（μg/mL）。

3.几丁质酶（Chitinase）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每小时生成 1 μg N-乙酰氨基葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{Chitinase（U/mg prot）} = \frac{x \times V_{酶促}}{V_{样} \times Cpr \times T} = \frac{2.5 \times x}{Cpr}$$

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每小时生成 1 μg N-乙酰氨基葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{Chitinase（U/g）} = \frac{x \times V_{酶促} \times V_{样总} \times D}{V_{样} \times W \times T} = \frac{2.5 \times x \times D}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细胞每小时生成 1 μg N-乙酰氨基葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{Chitinase（U/10}^4\text{ cell）} = \frac{x \times V_{酶促} \times V_{样总} \times D}{V_{样} \times 细菌或细胞数量 \times T} = \frac{2.5 \times x \times D}{细菌或细胞数量}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每小时生成 1 μg N-乙酰氨基葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{Chitinase（U/mL）} = \frac{x \times V_{酶促} \times D}{V_{样} \times T} = 2.5 \times x \times D$$

注释：V 酶促：酶促反应总体积，0.2 mL；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.08 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计，若 500 万细菌或细胞则代入 500 即可；T：酶促反应时间，1 h；D：粗酶液稀释倍数，若未稀释则为 1。

四、注意事项

①若 A 测定或ΔA 测定超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将粗酶液使用**提取液**适当稀释后或缩短酶促反应时间（第一次 37℃准确反应 1 h 缩短至 0.5 h）后再进行测定；低于最低值建议适当增加样本量或延长酶促反应时间（第一次 37℃准确反应 1 h 延长至 3 h 以上）后再进行测定，计算时相应修改；

②为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

Notes:

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.