

土壤几丁质酶（Soil Chitinase, S-Chitinase）试剂盒说明书

微量法 100T/48S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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(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。

测定原理：

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。

自备实验用品及仪器：

天平、水浴锅、离心机、震荡仪、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板，甲苯、蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 4mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 65mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

样品处理：

新鲜土样风干，过 30-50 目筛。

测定操作表：

| | 对照管 | 测定管 |
|---|-----|-----|
| 土样 (g) | 0.1 | 0.1 |
| 甲苯 (μL) | 15 | 15 |
| 混匀，25℃ 静置 15min | | |
| 蒸馏水 (μL) | 100 | |
| 试剂一 (μL) | | 100 |
| 混匀，37℃ 培养 24h | | |
| 蒸馏水 (μL) | 200 | 200 |
| 4000rpm，4℃，离心 10min，取上清 200μL 于新的 EP 管中 | | |
| 试剂二 (μL) | 20 | 20 |
| 混匀，沸水浴 5min | | |

| 试剂三 (μL) | 600 | 600 |
|--|-----|-----|
| 混匀, 37℃显色 20min, 取 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板中, 蒸馏水调零, 测定 585nm 处吸光值, 记为 A 对照管和 A 测定管, ΔA=A 测定管-A 对照管。 | | |

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: $y=5.2714x-0.0007$, $R^2=0.9989$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值 ΔA 。

酶活性定义: 37℃条件下, 每克土壤每天分解几丁质产生 1μg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤几丁质酶活性 } (\mu\text{g/d/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0007) \div 5.2714 \times V \text{ 反总} \div W \div T \times 1000 \\ &= 598 \times (\Delta A + 0.0007) \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.315mL; W: 样本质量, 0.1g; T: 反应时间, 1d; 1000: 1mg/mL=1000μg/mL

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y=2.6357x-0.0007$, $R^2=0.9989$; x 为标准品浓度 (μg/mL), y 为吸光值 ΔA 。

酶活性定义: 37℃条件下, 每克土壤每天分解几丁质产生 1μg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤几丁质酶活性 } (\mu\text{g/d/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0007) \div 2.6357 \times V \text{ 反总} \div W \div T \times 1000 \\ &= 1195 \times (\Delta A + 0.0007) \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.315mL; W: 样本质量, 0.1g; T: 反应时间, 1d; 1000: 1mg/mL=1000μg/mL

注意事项:

试剂一充分混匀后再使用。