

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

分光光度法 50 管/24 样

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、1 mL 玻璃比色皿，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 50mL×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)	0.2	0.2
甲苯 (μL)	30	30
混匀，25℃静置 15min		
蒸馏水 (μL)	200	
试剂一 (μL)		200
混匀，37℃培养 24h		
蒸馏水 (μL)	400	400
4000rpm，4℃，离心 30min，取上清 300μL 于新的 EP 管中		
试剂二 (μL)	30	30
混匀，沸水浴 5min		
试剂三 (μL)	900	900
混匀，37℃显色 20min，取 1mL 于 1mL 玻璃比色皿中，蒸馏水调零，测定 544nm 处吸光值，记为 A 对照管和 A 测定管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

计算公式

标准曲线: $y=5.2714x-0.0007$, $R^2=0.9989$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$), y 为吸光值 ΔA 。

酶活性定义: 37°C条件下, 每克土壤每天分解几丁质产生 $1\mu\text{g}$ 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, 0.63mL; W: 样本质量, 0.2g; T: 反应时间, 1d; 1000: $1\text{mg/mL}=1000\mu\text{g/mL}$

注意事项

1. 试剂一充分混匀后再使用。