

CheKine™ 几丁质酶活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB3012

规格: 48 T/24 S

96 T/48 S

批号: 见产品标签

	检测范围: 0.15-1.6 mg/mL		灵敏度: 0.15 mg/mL
	适用样本: 动物组织、真菌、液体		
	保质期: 4℃, 避光保存 6 个月		

01 背景与原理

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。

本试剂盒检测原理是几丁质酶水解几丁质产生 N-乙酰-D-氨基葡萄糖, 进一步与 DNS 试剂反应产生棕红色化合物, 在 540 nm 处有特征吸收峰, 吸光值增加速率反映了几丁质酶的活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	120 mL	4℃
Reagent I	3 mL	6 mL	4℃
Reagent II	6 mL	12 mL	4℃, 避光保存
Reagent III	10 mL	20 mL	4℃, 避光保存
Standard	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 540 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	试剂配制用
其他	匀浆器或研钵（组织样本）、恒温箱、制冰机、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 避光保存；Reagent II 为饱和溶液，使用前充分摇匀
Reagent III	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 避光保存；Reagent III 有一定的刺激性，建议在使用过程中做好个人防护
5 mg/mL Standard	临用前配制；每瓶加入 1 mL 去离子水，充分溶解，即 5 mg/mL N-乙酰-D-氨基葡萄糖 Standard；使用前平衡到室温	未用完的试剂 4℃ 避光保存可稳定 1 个月

05-1-2 标准品配制

使用 5 mg/mL N-乙酰-D-氨基葡萄糖，按照下表所示，进一步稀释标准品。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	5 mg/mL Standard 体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	浓度 (mg/mL)
1	80	170	1.6
2	70	180	1.4
3	60	190	1.2
4	50	200	1.0
5	40	210	0.8
6	30	220	0.6
7	20	230	0.4
8	7.5	242.5	0.15
空白	0	200	0

05-2 样本制备

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，则把分装的组织块和真菌保存在-80℃，一个月内使用。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。

- 动物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，用匀浆器或研钵冰浴匀浆，10000 g，4℃离心 20 min，取上清液，置冰上待测。
- 真菌：收集 5×10⁶ 个真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗真菌，离心后弃上清，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴超声波破碎真菌 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），然后 10000 g，4℃离心 20 min，取上清液，置冰上待测。
- 液体：直接检测。若溶液呈现浑浊，10000 g，4℃离心 20 min，取上清液，置冰上待测。

05-3 实验步骤

- 1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 540 nm。
- 2. 检测体系配制：空白孔和标准孔只需做 1-2 次，每个测定孔均需设置一个对照孔。在 1.5 mL EP 管中按照如下方式操作：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
样本	100	0	0	0
灭活样本（沸水浴 10 min）	0	100	0	0
Reagent I	50	50	0	0
Reagent II	100	100	0	0
混匀，37℃孵育 1 h。沸水浴 5 min 终止反应，室温冷却后 8000 g，4℃离心 10 min，取上清液			0	0
上清液	175	175	0	0
Standard	0	0	175	0
去离子水	0	0	0	175
Reagent III	125	125	125	125

- 3. 吸光度检测：混匀，95℃准确孵育 5 min，迅速流水冷却后取 200 μL 至 96 孔板中，记录 540 nm 处吸光值，测定孔记为 A_{测定}，对照孔记为 A_{对照}，标准孔记为 A_{标准}，空白孔记为 A_{空白}。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。

2. 标准曲线绘制

以标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta A_{标准}$ 为 x 轴，绘制标准曲线。将 $\Delta A_{测定}$ 代入方程得到 y 值（mg/mL）。

3. 样本几丁质酶活性的计算

- 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：37℃，每 mg 组织蛋白每小时分解几丁质产生 1 mg N-乙酰-D-氨基葡萄糖定义为一个酶活力单位。

几丁质酶(U/mg prot)=(V_{反总}×y)÷(V_样×Cpr)÷T=2.5y÷Cpr

- 按样本质量计算：

单位的定义：37℃，每 g 组织每小时分解几丁质产生 1 mg N-乙酰-D-氨基葡萄糖定义为一个酶活力单位。

几丁质酶(U/g)=(V_{反总}×y)÷(W×V_样÷V_{样总})÷T=2.5y÷W

- 按真菌数量计算：

单位的定义：37℃，每 10⁴ 个真菌每小时分解几丁质产生 1 mg N-乙酰-D-氨基葡萄糖定义为一个酶活力单位。

几丁质酶(U/10⁴)=(V_{反总}×y)÷(N×V_样÷V_{样总})÷T=2.5y÷N

● 按样本体积计算：

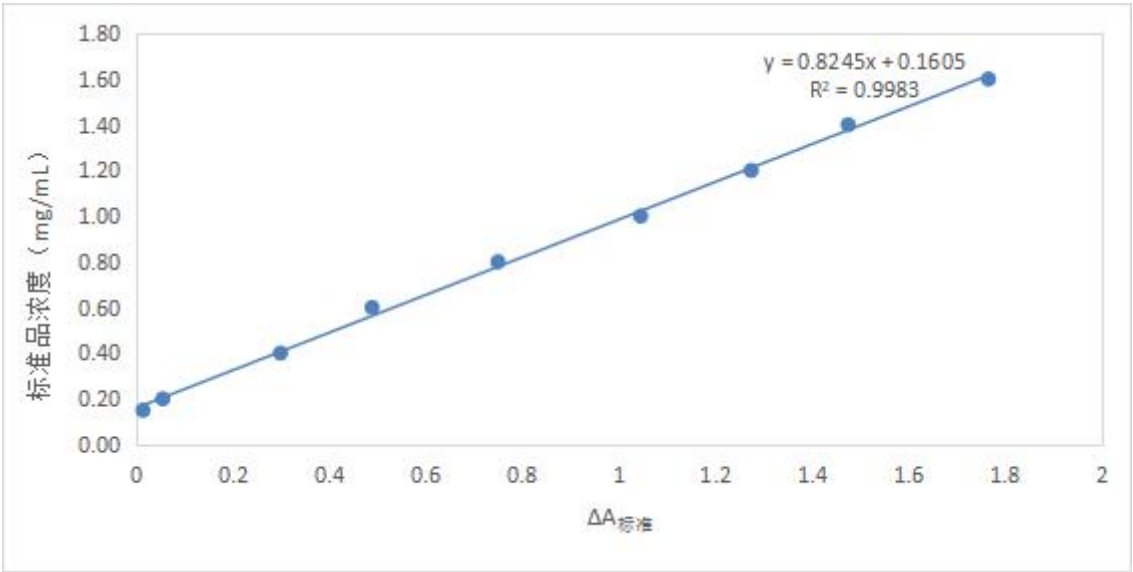
单位的定义：37℃，每 mL 液体每小时分解几丁质产生 1 mg N-乙酰-D-氨基葡萄糖定义为一个酶活力单位。

几丁质酶(U/mL)=(V_{反总}×y)÷V_样÷T=2.5y

V_{反总}：反应体系总体积，0.25 mL；V_样：加入反应体系中样本体积，0.1 mL；V_{样总}：加入 Extraction Buffer 体积，1 mL；T：反应时间：1 h；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：真菌数量，以 10⁴ 为单位（例如细胞数量为 5×10⁶，N=500）。

07 结果展示

典型标准曲线：y=0.8245x+0.1605，R²=0.9983



示例-1: 取 0.100 g 罗氏虾肝胰腺，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得ΔA_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=1.029-0.525=0.504 代入标准曲线，计算 y=0.576。按样本质量计算得：几丁质酶(U/g)=2.5y÷W=14.4 U/g。

08 FAQ

● 检测得到的样本ΔA_{测定} 过高或者过低怎么办？

如果ΔA_{测定} 小于 0.01 可适当加大样本量。如果ΔA_{测定} 大于 1.6 mg/mL 的ΔA_{标准}，可减少提取用样本量，再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1150	CheKine™ 过氧化物酶（POD）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1030	CheKine™ 超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1040	CheKine™ 过氧化氢酶（CAT）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 几丁质酶活性检测流程示意图

(Abbking 货号：KTB3012)

