

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 10min，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 585nm 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（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 1 μ g N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位。

土壤几丁质酶活性（ μ g/d/g 土样） = $(\Delta A + 0.0007) \div 5.2714 \times V_{\text{反总}} \div W \div T \times 1000$
= $598 \times (\Delta A + 0.0007)$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.63mL； W ：样本质量，0.2g； T ：反应时间，1d； 1000： 1mg/mL=1000 μ g/mL

注意事项：

1. 试剂一充分混匀后再使用。