

## 果胶酶 (pectinase) 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：**

果胶酶 (pectinase) 是一类分解果胶质酶类的总称，包括原果胶酶，果胶酯酶，多聚半乳糖醛酸酶和果胶裂解酶四大类，广泛存在于植物果实和微生物中，主要用于食品、酿酒、环保、医药、纺织及日化用品行业。

**测定原理：**

果胶酶水解果胶生成半乳糖醛酸，具有还原性醛基，与 DNS 试剂反应生成红棕色物质，在 540nm 有特征吸收峰，测定 540nm 处吸光值变化可计算得果胶酶活性。

**自备实验用品及仪器：**

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅。

**试剂组成和配制：**

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×2 瓶，4℃ 保存；临用前加入 7.5mL 试剂一，50℃ 加热溶解，用不完的试剂 4℃ 保存一周。

试剂三：液体 20mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

**酶液提取：**

1. 组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。10000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 ( $10^4$  个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 10000g，4℃ 离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 细胞培养液等：直接检测。

**测定操作表：**

	对照管	测定管
试剂二 (μL)	120	120
50℃ 水浴温育 5min		
样本 (μL)		30
煮沸样本 (μL)	30	
混匀，50℃ 水浴反应 30min		
试剂三 (μL)	150	150
沸水浴 5min，冰浴冷却终止反应，8000g，4℃，离心 10min，蒸馏水调零，取上清于微量石英比色皿或 96 孔板测定 540nm 处吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。		

**酶活性计算公式：**

- a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线:  $y = 3.9642x - 0.008$ ;  $R^2 = 0.9996$ ;  $x$  为标准品浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $y$  为吸光值。

1. 按照蛋白浓度计算

**酶活性定义:** 在  $50^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}3.5$  条件下, 每毫克蛋白每小时分解果胶产生  $1\text{mg}$  半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果胶酶活性 (mg/h/mg prot)} &= (\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

**酶活性定义:** 在  $50^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}3.5$  条件下, 每克样本每小时分解果胶产生  $1\text{mg}$  半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果胶酶活性 (mg/h/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times W \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div W \end{aligned}$$

3. 按细胞数量计算

**酶活性定义:** 在  $50^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}3.5$  条件下, 每  $10^4$  细胞每小时分解果胶产生  $1\text{mg}$  半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果胶酶活性 (mg/h/}10^4\text{cell)} &= (\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{细胞数量} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 细胞培养液

**酶活性定义:** 在  $50^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}3.5$  条件下, 每毫升培养液每小时分解果胶产生  $1\text{mg}$  半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\text{果胶酶活性 (mg/h/mL)} = (\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T = 2.523 \times (\Delta A + 0.008)$$

$V$  反总: 反应总体积,  $0.15\text{mL}$ ;  $V$  样: 反应中样本体积,  $0.03\text{mL}$ ;  $V$  样总: 加入提取液体积,  $1\text{mL}$ ;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $W$ , 样本质量,  $\text{g}$ ;  $T$ : 反应时间,  $0.5\text{h}$

**b. 用 96 孔板测定的计算公式如下**

标准曲线:  $y = 1.9821x - 0.008$ ,  $R^2 = 0.9996$ ;  $x$  为标准品浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $y$  为吸光值。

1. 按照蛋白浓度计算

**酶活性定义:** 在  $50^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}3.5$  条件下, 每毫克蛋白每小时分解果胶产生  $1\text{mg}$  半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果胶酶活性 (mg/h/mg prot)} &= (\Delta A + 0.008) \div 1.9821 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 5.045 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

**酶活性定义:** 在  $50^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}3.5$  条件下, 每克样本每小时分解果胶产生  $1\text{mg}$  半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果胶酶活性 (mg/h/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.008) \div 1.9821 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times W \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 5.045 \times (\Delta A + 0.008) \div W \end{aligned}$$

3. 按细胞数量计算

**酶活性定义:** 在  $50^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}3.5$  条件下, 每  $10^4$  细胞每小时分解果胶产生  $1\text{mg}$  半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{果胶酶活性 (mg/h/}10^4\text{cell)} &= (\Delta A + 0.008) \div 1.9821 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{细胞数量} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 5.045 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 细胞培养液

**酶活性定义:** 在  $50^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}3.5$  条件下, 每毫升培养液每小时分解果胶产生  $1\text{mg}$  半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\text{果胶酶活性 (mg/h/mL)} = (\Delta A + 0.008) \div 1.9821 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T = 5.045 \times (\Delta A + 0.008)$$

$V$  反总: 反应总体积,  $0.15\text{mL}$ ;  $V$  样: 反应中样本体积,  $0.03\text{mL}$ ;  $V$  样总: 加入提取液体积,  $1\text{mL}$ ;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $W$ , 样本质量,  $\text{g}$ ;  $T$ : 反应时间,  $0.5\text{h}$

**注意事项:**

1. 试剂二若有沉淀析出，请置于 50°C 加热溶解。
2. 测定之前请先做预实验，如果吸光值较高或较低，请用提取液做适当的稀释或者加大样本量，并在计算公式中乘以稀释倍数或者以实际加入的样本体积参与计算。
3. 煮沸样本建议在沸水中煮沸 10 分钟，以将酶彻底灭活。



Lifemall.asia

To be with you