

## 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, $\Delta A = A$ 测定管 - A 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, mg/mL; y 为吸光值。

1. 按照蛋白浓度计算

**酶活性定义:** 在 50℃, pH3.5 条件下, 每毫克蛋白每小时分解果胶产生 1mg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

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

2. 按照样本质量计算

**酶活性定义:** 在 50℃, pH3.5 条件下, 每克样本每小时分解果胶产生 1mg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

订购电话: 0512-62956165    技术支持: 18015581827    投诉电话: 18112525205

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

### 3. 按细胞数量计算

**酶活性定义:** 在 50°C, pH3.5 条件下, 每 10<sup>4</sup> 细胞每小时分解果胶产生 1mg 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°C, pH3.5 条件下, 每毫升培养液每小时分解果胶产生 1mg 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, 0.15mL; V 样: 反应中样本体积, 0.03mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W, 样本质量, g; T: 反应时间, 0.5h

#### 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, mg/mL; y 为吸光值。

#### 1. 按照蛋白浓度计算

**酶活性定义:** 在 50°C, pH3.5 条件下, 每毫克蛋白每小时分解果胶产生 1mg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

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

#### 2. 按照样本质量计算

**酶活性定义:** 在 50°C, pH3.5 条件下, 每克样本每小时分解果胶产生 1mg 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°C, pH3.5 条件下, 每 10<sup>4</sup> 细胞每小时分解果胶产生 1mg 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°C, pH3.5 条件下, 每毫升培养液每小时分解果胶产生 1mg 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, 0.15mL; V 样: 反应中样本体积, 0.03mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W, 样本质量, g; T: 反应时间, 0.5h

### 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。