

## 果胶酶 (pectinase) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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

### 试剂组成和配制:

产品名称	PCS007-50T/24S	Storage
提取液: 液体	50ml	4°C
试剂一: 液体	30ml	4°C
试剂二: 粉剂	2 瓶	4°C
试剂三: 液体	30ml	4°C避光
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×2 瓶, 4°C保存; 临用前加入 12.5ml 试剂一, 50°C加热溶解, 用不完的试剂 4°C保存一周。

### 自备仪器和用品:

天平、低温离心机、可见分光光度计、1 ml 玻璃比色皿、恒温水浴锅。

### 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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、细菌、真菌: 按照细胞数量 (10<sup>4</sup> 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°C离心 10min, 取上清置于冰上待测。

3、细胞培养液等: 直接检测。

### 测定步骤:

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



	对照管	测定管
试剂二 (μl)	400	400
50°C水浴温育 5min		
样本 (μl)		100
煮沸样本 (μl)	100	
混匀, 50°C水浴反应 30min		
试剂三 (μl)	500	500

沸水浴 5min, 冰浴冷却终止反应, 8000g, 4°C, 离心 10min, 取上清, 蒸馏水调零, 1ml 玻璃比色皿测定 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。

### 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。

### 酶活性计算公式:

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°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。

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

#### 2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 50°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。

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

#### 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, 0.5ml; V 样: 反应中样本体积, 0.1ml; V 样总: 加入提取液体积, 1ml; C<sub>pr</sub>: 样本蛋白浓度, mg/ml; W, 样本质量, g; T: 反应时间, 0.5h。

