

## 果胶酶 (pectinase) 试剂盒说明书

### 微量法 100T/48S

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	PCS008-100T/48S	Storage
提取液：液体	100ml	4°C
试剂一：液体	20ml	4°C
试剂二：粉剂	2 瓶	4°C
试剂三：液体	20ml	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 7.5ml 试剂一，50°C加热溶解，用不完的试剂 4°C保存一周。

#### 需自备仪器和用品：

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。

#### 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)	120	120
50°C水浴温育 5min		
样本 (μl)		30
煮沸样本 (μl)	30	
混匀, 50°C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°C, 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。

### 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。  
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:

#### 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°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，0.15ml；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。

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

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 104 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。

$$\begin{aligned} \text{果胶酶活性 (mg/h/104cell)} &= (\Delta A + 0.008) \div 1.9821 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{细胞数量} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 5.045 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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

