

## 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<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℃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（ $\mu$ L）	120	120
50℃水浴温育5min		
样本（ $\mu$ L）		30
煮沸样本（ $\mu$ L）	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°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, ΔA=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°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。

$$\begin{aligned} \text{果胶酶活性 (mg/h/104cell)} &= (\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

##### 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。

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

$V_{\text{反总}}$ : 反应总体积, 0.15mL;  $V_{\text{样}}$ : 反应中样本体积, 0.03mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $C_{\text{pr}}$ : 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

### 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。