

## 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（ $\mu\text{L}$ ）	120	120
50℃ 水浴温育 5min		
样本（ $\mu\text{L}$ ）		30
煮沸样本（ $\mu\text{L}$ ）	30	
混匀，50℃ 水浴反应 30min		
试剂三（ $\mu\text{L}$ ）	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，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  $10^4$  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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：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  $10^4$  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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：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

**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。