

果胶酶 (pectinase) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

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、1 mL 玻璃比色皿、恒温水浴锅。

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存。

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

试剂三：液体 30mL×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)	400	400
50℃ 水浴温育 5min		
样本 (μL)		100
煮沸样本 (μL)	100	
混匀，50℃ 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℃，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。		

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 ， $\text{pH}3.5$ 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。

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

2. 按照样本质量计算

酶活性定义： 在 50°C ， $\text{pH}3.5$ 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 ， $\text{pH}3.5$ 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 ， $\text{pH}3.5$ 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， 0.5mL ； $V_{\text{样}}$ ： 反应中样本体积， 0.1mL ； $V_{\text{样总}}$ ： 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。