



## 果胶酶活性检测试剂盒

### Pectinase Assay Kit

微量法

产品编号: AK499M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES499	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK499-A	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK499-B	粉剂×2 瓶	4℃保存; 临用前加入7.5mL AK499-A, 50℃加热溶解, 用不完的试剂4℃保存一周。
AK499-C	20mL×1 瓶	4℃避光保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

**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。

**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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、天平、低温离心机、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 ES499), 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 ES499), 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。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm 处, 蒸馏水调零;
2. 操作表 (在 EP 管中依次加入)

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)
AK499-B	120	120
50℃水浴温育 5min		
样本		30
煮沸样本	30	
混匀, 50℃水浴反应 30min		
AK499-C	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。

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

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。

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

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。

果胶酶活性 (mg/h /  $10^4$  cell) =  $(\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$

=  $2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{细胞数量}$

4. 细胞培养液体积计算

**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。

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

**注:**  $V_{\text{反总}}$ : 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。

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

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。

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

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。

果胶酶活性 (mg/h /  $10^4$  cell) =  $(\Delta A + 0.008) \div 1.9821 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$

=  $5.045 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{细胞数量}$

4. 细胞培养液体积计算

**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。

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

**注:**  $V_{\text{反总}}$ : 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. AK499-B 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。