

果胶酶（pectinase）检测试剂盒（微量法）

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。

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：

- 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。
- 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。
- 细胞培养液等：**直接检测。

测定步骤表：

	对照管	测定管
试剂二（ μL ）	120	120
50℃ 水浴温育 5min		
样本（ μL ）		30
煮沸样本（ μL ）	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℃，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℃，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℃，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℃，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。果胶酶活性 (mg/h / 10⁴ 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

酶活性定义：在 50℃，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) = $(\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$
= $2.523 \times (\Delta A + 0.008)$

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, R² = 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℃，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℃，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℃，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。果胶酶活性 (mg/h / 10⁴ 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

酶活性定义：在 50℃，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) = $(\Delta A + 0.008) \div 1.9821 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$
= $5.045 \times (\Delta A + 0.008)$

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℃ 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。