

## 果胶酶/果胶甲酯酶检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHA5-C24	果胶酶/果胶甲酯酶检测试剂盒	24T	常量法

### 一、测定意义：

果胶酶（pectinase）是分解果胶的酶类，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，广泛存在于高等植物果实和微生物中，是水果加工中最重要的酶。

### 二、测定原理：

果胶酶水解果胶生成半乳糖醛酸，半乳糖醛酸与 DNS 试剂反应生成在 540nm 有特征吸收峰的棕红色物质，测定 540nm 处吸光值变化可计算得果胶酶活性。

### 三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	保存条件
提取液	液体 40 mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一 A	粉剂×1 支	4℃ 保存
试剂二 B	液体 40 mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	液体 40 mL×1 瓶	4℃ 保存
标准品	粉剂×1 支	4℃ 保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：将试剂一 A 倒入试剂一 B 于 50℃ 水浴中溶解（期间可拿出振荡数次）该试剂易长菌，配制完成后可 -20℃ 分装保存，可保存 12 周。
- 2、标准品：10mg 半乳糖醛酸。临用前加入 0.943mL 蒸馏水，配成 50μmol/mL 的标准液。

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

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. 细胞、细菌或真菌：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。（细菌、真菌等难以数量计算的微生物也可以称取 0.1g 细菌/真菌沉淀来进行前处理）

3. 培养液：直接测定。

### 测定步骤

- 1、可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。
- 2、将 50 $\mu$ mol/mL 标准液用蒸馏水稀释为 6、5、4、3、2、1  $\mu$ mol/mL 的标准溶液备用。
- 3、取 125 $\mu$ L 样本沸水浴 10min 备用。
- 4、样本测定（在 1.5mL 离心管中）：

试剂名称	对照管	测定管	标准管	空白管
试剂一（ $\mu$ L）	500	500	500	500
50 $^{\circ}$ C 水浴温育 5min				
标准溶液（ $\mu$ L）	-	-	125	-
样本（ $\mu$ L）	-	125	-	-
蒸馏水（ $\mu$ L）	-	-	-	125
煮沸样本（ $\mu$ L）	125	-	-	-
混匀，50 $^{\circ}$ C 水浴反应 30min，马上沸水浴 5min，冷却后 8000g，常温离心 10min，取上清。				
上清液（ $\mu$ L）	500	500	500	500
试剂二（ $\mu$ L）	500	500	500	500
沸水浴 5min，冰浴冷却终止反应，测定 540nm 处吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。				

### 五、果胶酶活性计算：

#### 1、标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的  $\Delta A_{\text{标准}}$  为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程  $y = kx + b$ ，将  $\Delta A$  带入方程得到 x（ $\mu$ mol/mL）

#### 2、果胶酶活性的计算：

##### （1）按蛋白浓度计算

酶活定义：在 50 $^{\circ}$ C，pH3.5 条件下，每毫克蛋白每小时分解果胶产生 1 $\mu$ mol 半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位。果胶酶活性（U/mg prot）=  $x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 2x \div C_{\text{pr}}$

##### （2）按样本质量计算

酶活定义：在 50 $^{\circ}$ C，pH3.5 条件下，每克样本每小时分解果胶产生 1 $\mu$ mol 半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位。果胶酶活性（U/g 质量）=  $x \times V_{\text{提取}} \div W \div T = 2x \div W$

##### （3）按照细菌数量计算

酶活定义：在 50 $^{\circ}$ C，pH3.5 条件下，每 10<sup>4</sup> 个细菌每小时分解果胶产生 1 $\mu$ mol 半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位。果胶酶活性（U/10<sup>4</sup> cell）=  $x \times V_{\text{提取}} \div T \div \text{细菌数量（万个）} = 2x \div \text{细菌数量（万个）}$

##### （4）按液体体积计算

酶活定义：在 50 $^{\circ}$ C，pH3.5 条件下，每 mL 样本每小时分解果胶产生 1 $\mu$ mol 半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位。果胶酶活性（U/mL）=  $x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 2x$

$V_{\text{提取}}$ ：提取液体积，1mL； $V_{\text{样}}$ ：加入的样本体积，0.125mL； $C_{\text{pr}}$ ：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、A 大于 1.5 时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定。
- 2、植物果实组织建议将样本稀释 10 倍或 20 倍后再测定。

### 六、计算举例：

1. 0.1g 猕猴桃加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆，然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上稀释 10 倍后按照测定步骤操作，测得计算  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 1.465 - 1.45 = 0.015$ ，依据标准曲线  $y = 0.2575x - 0.2214$ ，计算得  $x = 0.918 \mu\text{mol/mL}$ ，按样本质量计算酶活得：  
果胶酶活性 (U/g 质量) =  $2x \div W \times 10$  (稀释倍数) = 183.6 U/g 质量。

### 七、相关产品：

- 1、植物丙二醛 (MDA) 含量检测试剂盒
- 2、植物过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒
- 3、植物超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒

### 八、公司介绍

南京陌凡生物科技有限公司，是一家专业从事生化试剂研发、试剂盒经营的高科技生物工程企业。总部位于江苏南京，公司本着“以人为本、创新驱动、质量保障、诚信经营”核心理念。自公司成立伊始，长期聚焦科研客户关注的挑战与压力，致力于提供生化试剂盒领域有革新的产品和解决方案。产品覆盖面广，先后开发了氧化应激，能量代谢、植物逆境、离子类等类别的多种试剂及试剂盒。因可靠的质量、完善的售后服务和优势的价格，为客户及时获得真实可靠的检测数据，轻松发表高质量的研究论文保驾护航。