



## 果胶酶活性检测试剂盒

### Pectinase Assay Kit

分光光度法

产品编号: AK499V

产品规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

| 编号        | 规格       | 储存条件                                              |
|-----------|----------|---------------------------------------------------|
| ES499     | 50mL×1 瓶 | 4℃保存;                                             |
| AK499-A   | 35mL×1 瓶 | 4℃保存;                                             |
| AK499-B   | 粉剂×2 瓶   | 4℃保存; 临用前加入12.5mL AK499-A, 50℃加热溶解, 用不完的试剂4℃保存一周。 |
| AK499-C   | 40mL×1 瓶 | 4℃避光保存;                                           |
| AK499-标准品 | 粉剂×1 支   | 4℃保存; 临用前加入 0.943mL 蒸馏水, 配成 100μmol/mL 的标准液。      |

※ 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、1 mL 玻璃比色皿、天平、低温离心机、恒温水浴锅、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

**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, 然后 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. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm 处, 蒸馏水调零;
2. 煮沸样本: 建议在沸水中煮沸 10 分钟, 以将酶彻底灭活;
3. 将 100μmol/mL 标准液用蒸馏水稀释为 15、10、7.5、5、2.5、1.25 μmol/mL 的标准溶液备用;
4. 操作表 (在 EP 管中依次加入):

| 试剂名称         | 对照管 (ul) | 测定管 (ul) | 标准管 (ul) | 空白管 (ul) |
|--------------|----------|----------|----------|----------|
| AK499-A      |          |          | 400      | 400      |
| AK499-B      | 400      | 400      |          |          |
| 50℃水浴温育 5min |          |          |          |          |
| 样本           |          | 100      |          |          |
| 煮沸样本         | 100      |          |          |          |
| 标准品          |          |          | 100      |          |

|                                                                                                                                                                                                    |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 蒸馏水                                                                                                                                                                                                |     |     |     | 100 |
| 混匀，50℃水浴反应 30min                                                                                                                                                                                   |     |     |     |     |
| AK499-C                                                                                                                                                                                            | 500 | 500 | 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， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。<br>每个测定管需设一个对照管。 |     |     |     |     |

#### 酶活性计算公式：

- 标准曲线的绘制：以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的  $\Delta A$  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 ( $\mu\text{mol/mL}$ )。
- 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  $1\mu\text{mol}$  半乳糖醛酸为一个酶活力单位。  
 果胶酶活性 ( $\text{U/mg prot}$ ) =  $x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 2x \div C_{\text{pr}}$
- 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  $1\mu\text{mol}$  半乳糖醛酸为一个酶活力单位。  
 果胶酶活性 ( $\text{U/g 鲜重}$ ) =  $x \times V_{\text{提取}} \div W \div T = 2x \div W$
- 按细胞数量计算  
**酶活性定义：**在 50℃，pH3.5 条件下，每  $10^4$  细胞每小时分解果胶产生  $1\mu\text{mol}$  半乳糖醛酸为一个酶活力单位。  
 果胶酶活性 ( $\text{U}/10^4 \text{ cell}$ ) =  $x \times V_{\text{提取}} \div T \div \text{细菌数量 (万个)} = 2x \div \text{细菌数量 (万个)}$
- 细胞培养液体积计算  
**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  $1\mu\text{mol}$  半乳糖醛酸为一个酶活力单位。  
 果胶酶活性 ( $\text{U/mL}$ ) =  $x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 2x$   
**注：**V 样：反应中样本体积，0.1mL；V 提取：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：

- AK499-B 若有沉淀析出，请置于 50℃加热溶解。
- 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。