



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	60mL×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;
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/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、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 (10⁴ 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			120	120
AK499-B	120	120		
50℃水浴温育 5min				
样本		30		
煮沸样本	30			

标准品			30	
蒸馏水				30
混匀，50℃水浴反应 30min				
AK499-C	150	150	150	150
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， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。 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 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 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 (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 (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 (U/mL) = $x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 2x$
注：V 样：反应中样本体积，0.03mL；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。