



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（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_{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_{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。