

上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0513

Size: 100T/96S

## 果胶裂解酶检测试剂盒说明书

### 微量法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定，如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

#### 一、测定意义：

果胶裂解酶（EC4.2.2.10）是果胶酶的重要组成部分，催化果胶分子链的消除裂解。来源比较广泛，主要来源于微生物，在食品加工工业中提高果汁产量方面有重要意义，在减少环境污染和降低能源消耗方面也具有潜在的应用价值。

#### 二、测定原理：

果胶裂解酶作用于果胶中的  $\alpha$ -1,4 糖苷键，生成在还原端 C4 和 C5 之间位置具有不饱和键的不饱和寡聚半乳糖醛酸，在 235nm 处有特征吸收峰，测定 235nm 下吸光度的上升来表示果胶裂解酶的活性。

#### 三、需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、恒温水浴锅、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

#### 四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 120 mL×1 瓶	4℃ 保存	-
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	4℃ 保存	-

溶液的配制：试剂一：溶液中如果有沉淀存在，可以 50℃ 水浴助溶。

## 五、操作步骤：

### 1、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

(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 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。

(2) 培养液：直接测定。

### 2、测定步骤

(1) 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 235nm，蒸馏水调零。

(2) 操作表：

试剂名称	测定管	空白管
试剂一 (μL)	180	180
酶液 (μL)	20	-
蒸馏水 (μL)	-	20

充分混匀后测定 235nm 下的初始值 A1，40℃反应 30min 后再次测定吸光值 A2，计算  $\Delta A$  测定管 = A2 测定管 - A1 测定管， $\Delta A$  空白管 = A2 空白管 - A1 空白管， $\Delta A = \Delta A$  测定管 -  $\Delta A$  空白管。

## 六、果胶裂解酶活性计算

### 1. 按微量石英比色皿计算：

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：在 40℃，pH5.5 条件下，每毫克蛋白每分钟分解果胶产生 1nmol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量 为一个酶活力单位。

$$\text{PL 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 64.1 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

## (2) 按照样本质量计算

酶活性定义：在 40°C，pH5.5 条件下，每克组织每分钟分解果胶产生 1nmol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为 一个酶活力单位。

$$\text{PL 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 64.1 \times \Delta A \div W$$

## (3) 按照细菌、真菌数量计算

酶活性定义：在 40°C，pH5.5 条件下，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟分解果胶产生 1nmol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为 一个酶活力单位。

$$\text{PL 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ T = 64.1 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

## (4) 按照培养液体积计算

酶活性定义：在 40°C，pH5.5 条件下，每毫升培养液每分钟分解果胶产生 1nmol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为 一个酶活力单位。

$$\text{PL 活性 (U/mL)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 64.1 \times \Delta A$$

$\varepsilon$  : 不饱和半乳糖醛酸摩尔消光系数：5200 L/mol/cm; d: 比色皿光径，1cm; V<sub>反总</sub>: 反应总体积，0.0002 L; V<sub>样</sub>: 反应体系中样本体积，0.02mL; V<sub>样总</sub>: 加入提取液体积，1mL; C<sub>pr</sub>: 样本蛋白浓度，mg/mL; W, 样本质量，g; T: 反应时间，30min; 10<sup>9</sup>: 换算系数，1mol= 10<sup>9</sup>nmol。

## 2、按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 d=1cm 修改为 d=0.6cm (96 孔板光径) 进行计算即可。

### 七注意事项：

- 1、若  $\Delta A$  大于 0.5，将粗酶液用蒸馏水稀释后再进行测定。若 A 测定管大于 1.5 时，建议将样本用蒸馏水稀释后 再进行测定。
- 2、 建议一次测定不要测定过多样本以免耽误过多的酶促反应时间。
- 3、 空白管正常情况下变化不超过 0.02。