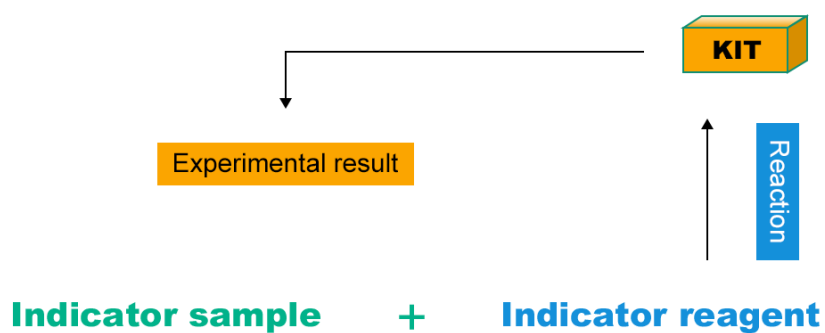


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0715

Size: 50T/24S

果胶酶检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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、需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、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 50mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 40mL × 1 瓶	4℃保存	若溶液中有不溶解物质，可以 50℃水浴溶解
试剂二	液体 40mL × 1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂 × 1 支	4℃保存	10mg 半乳糖醛酸，临用前加入 0.943mL 蒸馏水，配成 50μmol/mL 的标准液。

五、操作步骤：

● 粗酶液提取：

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，然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

菌类：按照细胞数量 (10^4 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。

液体：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，蒸馏水调零。
- 2、将 50μmol/mL 标准液用蒸馏水稀释为 6、5、4、3、2、1 μmol/mL 的标准溶液备用。
- 3、取 125μL 样本沸水浴 10min 备用。
- 4、操作表：（在 1.5mL 离心管中）

	对照管	测定管	标准管	空白管
试剂一 (μL)	500	500	500	500
50℃水浴温育 5min				
标准溶液 (μL)	—	—	125	—
样本 (μL)	—	125	—	—
蒸馏水 (μL)	—	—	—	125
煮沸样本 (μL)	125	—	—	—
混匀，50℃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 (μL)	500	500	500	500
试剂二 (μL)	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。				

六、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 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 ($\mu\text{mol/mL}$)

2、果胶酶活性的计算：

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义：在 50°C , 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 1 个酶活力单位。

$$\text{果胶酶活性 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 2x \div C_{\text{pr}}。$$

(2) 按样本质量计算

酶活定义：在 50°C , pH3.5 条件下, 每克样品每小时分解果胶产生 $1\mu\text{mol}$ 半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位。

$$\text{果胶酶活 (U/g 鲜重)} = x \times V_{\text{提取}} \div W \div T = 2x \div W。$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活定义：在 50°C , pH3.5 条件下, 每 10^4 个细胞每小时分解果胶产生 $1\mu\text{mol}$ 半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位。

$$\text{果胶酶活 (U/10}^4\text{ cell)} = x \times V_{\text{提取}} \div T \div \text{细胞数量 (万个)} = 2x \div \text{细胞数量 (万个)}。$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义：在 50°C , pH3.5 条件下, 每 mL 样本每小时分解果胶产生 $1\mu\text{mol}$ 半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位。

$$\text{果胶酶活 (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 2x。$$

V 提取: 提取液体积, 1mL; V 样: 加入的样品体积, 0.125mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g; T: 反应时间: 0.5h。

七、注意事项:

- 1、A 大于 1.5 时, 建议将样品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。