

果胶酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A140-1-1 Pectinase Kit DNS 显色法 50T/24 样)

一、测定原理:

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。

二、测定意义:

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。

三、自备仪器或用品:

天平、恒温离心机、可见分光光度计、1mL玻璃比色皿 (光径1cm)、恒温水浴锅。

四、试剂盒组成: (试剂盒有效期3个月)

提取液: 液体50mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂一: 液体30mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂二: 粉剂×2瓶, 4℃保存。临用前加入12.5mL试剂一, 50℃加热溶解, 保存一周。

试剂三: 液体30mL×1 瓶, 4℃避光保存。

五、粗酶液提取:

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 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 (10⁴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 3 分钟); 然后 10000g, 4℃ 离心 10 分钟, 取上清置于冰上待测。

3. 细胞培养液: 直接检测。

六、操作步骤:

	对照管	测定管
试剂二 (mL)	0.4	0.4
50℃水浴孵育5min		
样本 (mL)		0.1
煮沸的样本 (mL)	0.1	
混匀, 50℃水浴反应30min		
试剂三 (mL)	0.5	0.5
沸水浴5min, 冰浴冷却终止反应, 8000g, 4℃, 离心10min, 取上清, 波长540nm, 1mL玻璃比色皿 (光径1cm), 蒸馏水调零, 测定各管吸光度值A, ΔA=A		
测定管-A _{对照管} 。		

注: 每个待测样本需设定一个测定管和一个对照管。对照管粗酶液需要进行沸水浴处理后再进行取样待测。

七、单位定义与计算:

标准曲线: $y=3.9642x-0.008$, $R^2=0.9996$ 。

1. 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 1mg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位 (U)。

$$\begin{aligned} \text{果胶酶活力 (U/mgprot)} &= \frac{\Delta A + 0.008}{3.9642} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}} \div \text{Cpr}} \div T \\ &= 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 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 1mg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位 (U)。

$$\begin{aligned} \text{果胶酶活力 (U/g组织)} &= \frac{\Delta A + 0.008}{3.9642} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}} \div T \\ &= 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算:

酶活性定义: 在 50℃, pH3.5 条件下, 每 10⁴ 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 (U)。

$$\begin{aligned} \text{果胶酶活力 (U/10}^4 \text{ cells)} &= \frac{\Delta A + 0.008}{3.9642} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}} \times \text{细胞数} \div V_{\text{样总}}} \div T \\ &= 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{细胞数} \end{aligned}$$

4. 细胞培养液:

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 1mg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位 (U)。

$$\begin{aligned} \text{果胶酶活力 (U/mL)} &= \frac{\Delta A + 0.008}{3.9642} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \div T \\ &= 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \end{aligned}$$

V_{反总}: 反应总体积, 1mL;

V_样: 反应中样本体积, 0.1mL;

V_{样总}: 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。

八、注意事项:

1. 试剂一若有沉淀析出, 请置于 50℃ 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。