



# 果胶酶活性检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC2635

规格：100T/48S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 80 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一 A	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂一 B	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：将试剂一 A 倒入试剂一 B 于 50℃水浴中溶解（期间可拿出振荡数次）。该试剂易长菌，配制完成后可-20℃分装保存，可保存 12 周。
- 2、标准品：10mg 半乳糖醛酸。临用前加入 0.943mL 蒸馏水，配成 50μmol/mL 的标准液。

**产品说明：**

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。

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。

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。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。**

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

**操作步骤：**

**一、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，然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
- 2、菌类：按照细菌数量（10<sup>4</sup> 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细菌（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、液体：直接检测。

**二、测定步骤**

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热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 10、8、6、4、2、1 μmol/mL 的标准溶液备用。
- 3、取 40μL 样本沸水浴 10min 备用。
- 4、样本测定（在1.5mL离心管中）：

试剂名称	对照管	测定管	标准管	空白管
试剂一（μL）	200	200	200	200
50°C水浴温育5min				
标准溶液（μL）	-	-	40	-
样本（μL）	-	40	-	-
蒸馏水（μL）	-	-	-	40
煮沸样本（μL）	40	-	-	-
混匀，50°C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）	150	150	150	150
试剂二（μL）	150	150	150	150
沸水浴5min，冰浴冷却终止反应，吸取200μL于微量玻璃比色皿或96孔板中测定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。				

### 三、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  $\Delta A$  标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程  $y=kx+b$ ，将  $\Delta A$  带入方程得到 x（μmol/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 1μmol 半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位。

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

##### （2）按样本质量计算

酶活定义：在 50°C，pH3.5 条件下，每克样本每小时分解果胶产生 1μmol 半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位。

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

##### （3）按照细菌数量计算

酶活定义：在 50°C，pH3.5 条件下，每 10<sup>4</sup> 个细菌每小时分解果胶产生 1μmol 半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位。

果胶酶活性（U/10<sup>4</sup> cell）=  $x \times V_{\text{提取}} \div T \div \text{细菌数量（万个）} = 2x \div \text{细菌数量（万个）}$

##### （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 1μmol 半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位。

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

V 提取：提取液体积，1mL； V 样：加入的样本体积，0.04mL； 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：

- 1、A 大于 1.5 时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定。
- 2、植物果实组织建议将样本用提取液稀释 10 倍或 20 倍后再测定。

### 实验实例:

1、取 0.1g 苹果加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆，然后 10000g，4°C，离心 10min，取上清稀释 10 倍之后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 1.466 - 1.357 = 0.109$ ，带入标准曲线  $y = 0.1428x - 0.1022$ ，计算  $X = 1.479 \mu\text{mol/mL}$ ，按样本质量计算酶活得：

果胶酶活性 (U/g 质量) =  $2x \div W \times 10$  (稀释倍数) = 295.8 U/g 质量。

### 相关发表文献:

[1] Yuxing Wu, Liangsheng Xu, Zhiyuan Yin, et al. Transcription factor VmSeb1 is required for the growth, development, and virulence in *Valsa mali*. *Microbial Pathogenesis*. October 2018;132-138.(IF2.581)

[2] Yuxing Wu, Liangsheng Xu, Zhiyuan Yin, et al. Two members of the velvet family, VmVeA and VmVelB, affect conidiation, virulence and pectinase expression in *Valsa mali*. *Molecular Plant Pathology*. November 2017;(IF4.379)

### 相关系列产品:

BC3680 /BC3685 原果胶含量检测试剂盒

BC4120/BC4125 可溶性果胶含量检测试剂盒

BC4150/BC4155 离子结合型果胶 (ISP) 含量检测试剂盒

BC2640/BC2645 果胶裂解酶 (PL) 活性检测试剂盒