

（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K867-M

产品规格：96T (40 samples)

检测仪器：酶标仪(530-550 nm)

Elabscience®果胶酶比色法测试盒

Pectinase Activity Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织样本中果胶酶的活力。

检测原理

果胶酶(Pectinase)是分解果胶质的酶类，根据其作用底物的不同，可分为果胶酯酶、聚半乳糖醛酸酶和果胶裂解酶三类，广泛存在于高等植物和微生物中，在食品工业中有着广泛应用。

本试剂盒的检测原理为：果胶酶水解果胶生成的物质与显色剂加热反应生成棕红色物质，通过测定 540 nm 吸光值变化计算果胶酶活性。

本试剂盒检测植物组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法(货号：E-BC-K168-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格(Size) (96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	60 mL×2 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	2-8℃ 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 (Buffer Solution)	25 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	20 mL×1 瓶	2-8℃ 避光保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	2-8℃ 避光保存 6 个月
	酶标板	96 孔×1 块	无要求
	覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(530-550 nm，最佳检测波长 540 nm)，水浴锅，恒温箱

试剂准备

- ① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25℃)。
- ② 试剂四若有黄色沉淀析出，属正常现象，此时可70℃水浴加热10 min，自然冷却至25℃后待用。

③ 试剂二工作液的配制：

取一瓶试剂二加入25 mL的试剂三溶解，50℃水浴加热15 min (期间振荡3-5次)，溶解后待用。配制完成后可-20℃分装保存1个月。

④ 50 μmol/mL 标准品的配制：

取一支试剂五用 1 mL 试剂一溶解得到 50 μmol/mL 标准品溶液，未使用完的 50 μmol/mL 标准品溶液可 2-8℃ 保存 2 周。

⑤ 10 μmol/mL 标准品的配制：

按 50 μmol/mL 标准品溶液：试剂一体积比=1：4 稀释成 10 μmol/mL 标准品溶液，10 μmol/mL 标准品溶液可 2-8℃ 保存 3 天。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/mL)	0	1	2	3	4	6	8	10
10 μmol/mL 标准品(μL)	0	20	40	60	80	120	160	200
试剂一(μL)	200	180	160	140	120	80	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：试剂一体积(mL)=1：9的比例(如0.1 g组织样本，加入0.9 mL试剂一)，4℃，进行机械匀浆。4℃，10000 × g，离心10 min，取上清液置于冰盒上待测(8 h内进行测定)。留取部分上清液用于总蛋白浓度测定。

对照样本：取部分待测上清液沸水浴5 min(样本沸水浴后可能会有沉淀析出，无需离心，混匀即可)。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.15-20 U/mL，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%西红柿果肉组织	5-10	10%苹果果肉组织	10-20
10%脐橙果肉组织	5-10	10%脐橙果皮组织	10-20
10%香蕉皮组织	2-10	10%玉米种子组织	2-5

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

测定孔OD值大于1.8时，建议将样本用试剂一稀释后再进行测定。

操作步骤

- ① 标准管：取 50 μL 不同浓度的标准品溶液加入相应的标准管中；
测定管：取 50 μL 待测样本加入相应的测定管中。
对照管：取 50 μL 对照样本加入相应的对照管中。
- ② 向步骤①中的各管中加入 200 μL 试剂二工作液。
- ③ 混匀，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min。
- ④ 立刻沸水浴 5 min 终止反应，流水冷却。
- ⑤ 测定管和对照管 25 $^{\circ}\text{C}$ ，8000 $\times$ g，离心 5 min，上清液待用。
- ⑥ 各取 150 μL 上清液于新的对应的 EP 管中，加入 150 μL 的试剂四。
- ⑦ 将步骤⑥中的各管沸水浴 5 min，流水冷却，混匀，取 200 μL 溶液加入酶标板孔中，酶标仪 540 nm 测定各孔 OD 值。

操作表

酶促反应

	标准管	测定管	对照管
不同浓度的标准品(μL)	50	--	--
待测样本(μL)	--	50	--
对照样本(μL)	--	--	50
试剂二工作液(μL)	200	200	200
混匀，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min。			
立刻沸水浴 5 min 终止反应，流水冷却。			
测定管和对照管，25 $^{\circ}\text{C}$ ，8000 $\times$ g，离心 5 min，上清液待用。			

显色反应

	标准管	测定管	对照管
上清液(μL)	150	150	150
试剂四(μL)	150	150	150
沸水浴 5 min，流水冷却，混匀，取 200 μL 溶液加入酶标板孔中， 酶标仪 540 nm 测定各孔 OD 值。			

本试剂盒检测植物组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法(货号：E-BC-K168-M)。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织样本中果胶酶活力计算公式：

① 按样本质量计算：

定义：50℃，pH = 3.5 的条件下，每克组织样本每小时分解果胶产生 1 μmol 半乳糖醛酸所需的酶量为 1 个酶活力单位。

$$\text{果胶酶活力} \quad (\text{U/g wet weight}) = (\Delta A - b) \div a \div T \times f \div \frac{m}{V}$$

② 按蛋白浓度计算：

定义：50℃，pH = 3.5 的条件下，每毫克组织蛋白每小时分解果胶产生 1 μmol 半乳糖醛酸所需的酶量为 1 个酶活力单位。

$$\text{果胶酶活力} \quad (\text{U/mgprot}) = (\Delta A - b) \div a \div T \times f \div C_{pr}$$

注解：

y：标准孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA：测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

T：反应时间，0.5 h

f：加入检测体系前样本的稀释倍数

m：待测样本的质量，g

V：加入试剂一的体积，mL

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度，mgprot/mL

附录1 关键数据

1. 技术参数

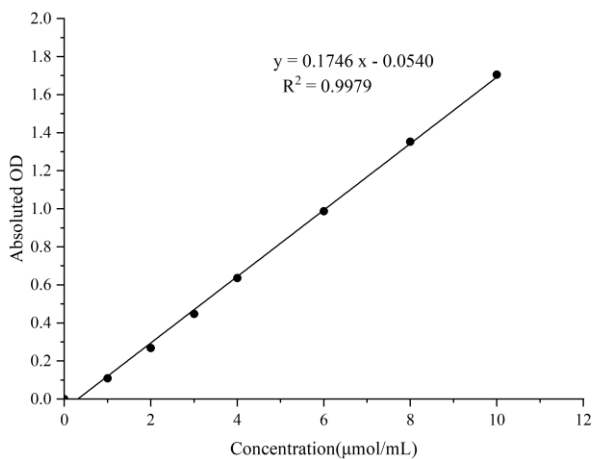
检测范围	0.15-20 U/mL	批间差	3.6-7.2%
灵敏度	0.15 U/mL	批内差	1.1-1.4%
稀释回收率	93-101%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量50 μL ，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	0	1	2	3	4	6	8	10
OD 值	0.105	0.214	0.373	0.556	0.746	1.099	1.460	1.822
	0.107	0.215	0.375	0.550	0.737	1.087	1.458	1.799
平均 OD 值	0.106	0.215	0.374	0.553	0.742	1.093	1.459	1.811
绝对 OD 值	0.000	0.109	0.268	0.447	0.636	0.987	1.353	1.705

② 绘制标曲(如下图)：



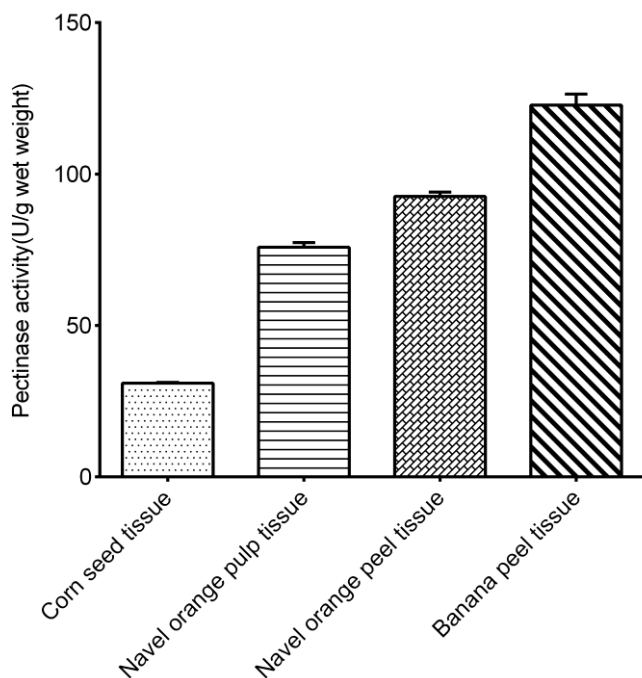
附录2 实例分析

例如检测玉米种子组织(数据仅供参考):

取 50 μL 稀释 2 倍的 10%玉米种子组织匀浆,按操作表操作,结果如下:
标准曲线 $y = 0.1746x - 0.0540$, 测定孔 OD 值为 0.721, 对照孔 OD 值为 0.625。计算结果为:

$$\begin{aligned}\text{果胶酶活力(U/g wet weight)} &= (0.721 - 0.625 + 0.054) \div 0.1746 \div 0.5 \times 2 \div 0.1 \times 0.9 \\ &= 30.93 \text{ U/g wet weight}\end{aligned}$$

按照说明书操作,测定玉米种子组织(10%匀浆稀释 2 倍,加样量 50 μL)、脐橙果肉组织(10%匀浆稀释 10 倍,加样量 50 μL)、脐橙果皮组织(10%匀浆稀释 10 倍,加样量 50 μL)、香蕉皮组织(10%匀浆稀释 10 倍,加样量 50 μL)中的果胶酶活力(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

