

果胶甲酯酶 (pectinesterase, PE) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-GH015 滴定法: 48样)

一、产品简介:

果胶甲酯酶, 属果胶酶系, 亦称果胶酯酶、果胶氧化酶。催化水解果胶长链上的甲氧酯水解产生小分子物质果胶酸和甲醇, 从而增加果胶在水中的溶解度。广泛存在于高等植物和可以降解细胞壁的细菌和真菌中, 起内源调控植物细胞壁上及细胞之间果胶含量的作用。

果胶甲酯酶 (PE) 催化水解果胶分子释放H⁺, 使反应体系的pH下降, 用碱液维持体系的pH始终保持在7.8(酚酞指示剂维持在粉红色), 通过碱消耗的NaOH 量反映果胶甲酯酶的活性。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 80mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 5 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 50mL 蒸馏水于瓶中, 混匀后于 60°C加热溶解 (中间可手动摇匀几次)。
试剂二	粉剂 1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.5mL 乙醇溶解备用。
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 25mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需仪器和用品:

天平、研钵、离心机、水浴锅或恒温培养箱。

四、果胶甲酯酶 (PE) 的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本: 取 0.5g 组织样品 (叶片类样本可取 0.15g), 加 1.5mL 提取液冰浴研磨, 12000rpm、4°C离心 15min, 取全部上清液待测。

【注】: 若酶活力太高, 可降低样本取样质量W或将上清液稀释2-5倍后再进行测定, 并在计算公式中乘以稀释倍数D。

② 细菌/培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1.5mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 试剂一于37°C烘箱保温10min。

② 取出1mL的上清液转移至离心管或试管中。

③ 向离心管或试管中依次加25μL 试剂二, 4mL试剂一, 混匀, 并用试剂三调pH至7.8 (粉红色)。

④ 将离心管或试管于37°C (水浴锅或恒温培养箱) 孵育60min。每隔20分钟用试剂四调节pH, 使其维持在7.8 (粉红色)。同时记录所消耗的试剂四的体积V₂ (mL)。

五、结果计算:

1、按照样本质量计算:

酶活定义: 每克组织每小时消耗1μmol NaOH 定义为一个酶活单位U。

PE 活性(μmol/h/g)=20×V₂÷(V₁÷V×W) ÷T×D =30×V₂÷W×D

2、按照蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克蛋白每小时消耗1μmol NaOH 定义为一个酶活单位U。

PE 活性($\mu\text{mol/h/mg prot}$)= $20 \times V_2 \div (V_1 \div V \times \text{Cpr}) \div T \times D = 30 \times V_2 \div \text{Cpr} \times D$

3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌或细胞每小时消耗 $1 \mu\text{mol NaOH}$ 定义为一个酶活单位 U。

PE 活性($\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}$)= $20 \times V_2 \div (V_1 \div V \times 500) \div T \times D = 0.06 \times V_2 \times D$

V1---加入离心管或试管中的上清液体积, 1mL; V---提取液体积, 1.5mL;

V2---滴定所消耗的试剂四的量, mL; T---反应时间, 60 min=1h;

D---样品稀释倍数; W---样品质量, g; 20---试剂四的NaOH 浓度, $20 \mu\text{mol/mL}$;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

Cpr---上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。