

## 果胶甲酯酶 (pectinesterase, PE) 试剂盒说明书

(货号: BP10416 滴定法: 48样 有效期: 6个月)

### 一、指标介绍:

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:

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度    | 注意事项                                                                                                    |
|------|-------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 80mL×1 瓶 | 4°C保存   |                                                                                                         |
| 试剂一  | 粉剂 5 瓶      | 4°C保存   | 每瓶:<br>1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩);<br>2. 加入 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);<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂二  | 粉剂 1 支      | 4°C避光保存 | 1. 临用前 8000g 4°C 离心 2min 使试剂落入管底;<br>2. 加入 1.5mL 乙醇溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                           |
| 试剂三  | 液体 15mL×1 瓶 | 4°C保存   | 1. 临用前稀释 10 倍使用, 如 1ml 试剂三加 9ml 蒸馏水;<br>2. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                               |
| 试剂四  | 液体 25mL×1 瓶 | 4°C保存   | 1. 临用前稀释 10 倍使用, 如 1ml 试剂四加 9ml 蒸馏水;<br>2. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                               |

### 三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、离心管、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

- 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 液体样本: 可直接测定, 或者适当稀释后测定。若浑浊, 离心后取上清检测。

- ③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℃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（ $10^4$  个）：提取液体积（mL）为 500：1 的比例进行提取。

## 2、检测步骤：

- ① 试剂一于37℃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℃（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。

$$\text{PE 活性}(\mu\text{mol/h/g})=20\times V2\div(V1\div V\times W)\div T\times D=30\times V2\div W\times D$$

### 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。

$$\text{PE 活性}(\mu\text{mol/h/mg prot})=20\times V2\div(V1\div V\times \text{Cpr})\div T\times D=30\times V2\div \text{Cpr}\times D$$

### 3、按照液体体积计算：

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。

$$\text{PE 活性}(\mu\text{mol/h/mL})=20\times V2\div V1\div T\times D=30\times V2\times D$$

### 4、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 1μmol NaOH 定义为一个酶活单位 U。

$$\text{PE 活性}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell})=20\times V2\div(V1\div V\times 500)\div T\times D=0.06\times V2\times D$$

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，20μmol/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。