

果胶裂解酶 (pectinate lyases, PL) 试剂盒说明书

微量法 100T/48S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

果胶裂解酶 (EC4.2.2.10) 是果胶酶的重要组成部分, 是一种能降解植物细胞壁, 导致植物组织软化甚至死亡的解聚酶, 来源比较广泛, 主要来源于微生物, 可用于果汁、果酒的澄清, 提高水果出汁率, 植物病毒的纯化, 纸浆的漂白和纺织品的生物精炼, 在减少环境污染和降低能源消耗方面具有潜在的应用价值。

测定原理:

果胶裂解酶作用于果胶中的 α -1,4 糖苷键, 生成在还原端 C4 和 C5 之间位置具有不饱和键的不饱和寡聚半乳糖醛酸, 在 235nm 处有特征吸收峰。

组成:

产品名称	PCS010-100T/48S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	6ml	4°C
试剂二: 液体	6ml	4°C
试剂三: 液体	6ml	4°C
说明书	一份	

自备仪器和用品:

天平、低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、恒温水浴锅。

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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、细菌、真菌: 按照细胞数量 (10^4 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 3min); 然后 10000g, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

3、培养液: 直接测定。

测定步骤:



1、分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 235nm，蒸馏水调零。

2、操作表：

	对照管	测定管
试剂一 (μl)		120
试剂二 (μl)	120	
40°C温育 3min		
酶液 (μl)	20	20
混匀，40°C反应 30min		
试剂三 (μl)	60	60
混匀于微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板) 测定 235nm 处吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定管-A 对照管。		

酶活性计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 组织中 PL 活性

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：在 40°C，pH5.5 条件下，每毫克蛋白每分钟分解果胶产生 1nmol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 64.1 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义：在 40°C，pH5.5 条件下，每克组织每分钟分解果胶产生 1nmol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 64.1 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

2. 细菌、真菌 PL 活性

酶活性定义：在 40°C，pH5.5 条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟分解果胶产生 1nmol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 64.1 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3. 培养液 PL 活性

酶活性定义：在 40°C，pH5.5 条件下，每毫升培养液每分钟分解果胶产生 1nmol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/ml)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 64.1 \times \Delta A \end{aligned}$$

ϵ ：不饱和半乳糖醛酸摩尔消光系数：5200L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应总体积，0.2ml；V 样：反应体系中样本体积，0.02ml；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，30min

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 组织中 PL 活性



(1) 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：在 40°C, pH5.5 条件下，每毫克蛋白每分钟分解果胶产生 1nmol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 128.2 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义：在 40°C, pH5.5 条件下，每克组织每分钟分解果胶产生 1nmol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 128.2 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

2. 细菌、真菌 PL 活性

酶活性定义：在 40°C, pH5.5 条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟分解果胶产生 1nmol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 128.2 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3. 培养液 PL 活性

酶活性定义：在 40°C, pH5.5 条件下，每毫升培养液每分钟分解果胶产生 1nmol 不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/ml)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 128.2 \times \Delta A \end{aligned}$$

ϵ : 不饱和半乳糖醛酸摩尔消光系数: 5200L/mol/cm; d : 比色皿光径, 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.2ml; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.02ml; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1ml; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/ml; W , 样本质量, g; T : 反应时间, 30min。

