

果胶裂解酶（pectinate lyases, PL）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

果胶裂解酶(反式消去酶，EC 4.2.2.10)是通过反式消去作用裂解果胶聚合体的一种果胶酶，主要来源于微生物，可提高水果出汁率，并在减少环境污染等方面具有潜在的应用价值。

果胶裂解酶（PL）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。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 12mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4℃保存

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板（UV 板）、天平、低温离心机、恒温水浴锅、研钵。

四、果胶裂解酶的测定：

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：

取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.2g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取

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 1mL 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。

③ 液体样本：

直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min，调节波长至 235nm。

② 试剂一和试剂二预先在 50℃水浴 5min。

③ 在 EP 管中按照下表依次加入试剂：

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
试剂一	120	
试剂二		120
上清液	20	20
混匀，50℃反应 30min		
试剂三	60	60
混匀，取 150 μ L 于 96 孔板（UV 板）测定 235nm 处吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定管-A		

对照管（每个样本做一个自身对照）。

- 【注】1. 若 A 测定管大于 2，可减少上清液取样量 V1（如减至 10 μ L 则用 10 μ L 的蒸馏水补齐），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。
2. 若 ΔA 在零附近徘徊，可适当增加上清液取样量 V1（如增至 40 μ L 则试剂三相应减少），或延长反应时间 T（如由 30min 延长至 60min），则改变后的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照蛋白浓度计算：

酶活性定义：在 50 $^{\circ}$ C，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。

$$\begin{aligned} \text{果胶裂解酶 (PL) 活性(nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2 \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 193.2 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

2、按照样本质量计算：

酶活性定义：在 50 $^{\circ}$ C，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。

$$\begin{aligned} \text{果胶裂解酶 (PL) 活性(nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2 \div (V1 \div V \times W) \div T \\ &= 193.2 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

3、按细菌/细胞密度计算：

单位定义：在 50 $^{\circ}$ C，每 1 万个细菌或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。

$$\begin{aligned} \text{果胶裂解酶 (PL) 活性(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2 \div (V1 \div V \times 500) \div T \\ &= 0.39 \times \Delta A \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

酶活性定义：在 50 $^{\circ}$ C，每毫升液体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。

$$\text{果胶裂解酶 (PL) 活性(nmol/min/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2 \div V1 \div T = 193.2 \times \Delta A$$

ϵ ---不饱和半乳糖醛酸摩尔消光系数：4600L/mol/cm；

d---比色皿光径，0.375cm；

V2---反应总体积，2 $\times 10^{-4}$ L；

V1---反应体系中上清液体积，0.02mL；

V---加入提取液体积，1mL；

W---样本质量，g；

T---反应时间，30min；

500---细菌或细胞总数，500 万；

Cpr----样本蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公式的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。