

果胶裂解酶 (pectinate lyases, PL) 试剂盒说明书

(紫外法 48 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,可提高水果榨汁率,并在减少环境污染等方面具有潜在应用价值。

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 60mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径 1cm)、天平、低温离心机、恒温水浴锅、研钵。

四、果胶裂解酶(PL)活性检测:

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 紫外分光光度计预热 30min,调节波长至 235nm,蒸馏水调零。

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	600	
试剂二		600
上清液	100	100
混匀, 50℃反应 30min		
试剂三	300	300
混匀,可转移 800 μ L 于 1mL 石英比色皿(光径 1cm)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 50 μ L 则用 50 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,可增加上清液取样量 V1(如增至 150 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°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。

$$\begin{aligned} \text{果胶裂解酶 (PL) 活性(nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2 \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 72.46 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

2、按照样本质量计算：

酶活性定义：在 50°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。

$$\begin{aligned} \text{果胶裂解酶 (PL) 活性(nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2 \div (V1 \div V \times W) \div T \\ &= 72.46 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

3、按细菌/细胞密度计算：

酶活性定义：在 50°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。

$$\begin{aligned} \text{果胶裂解酶 (PL) 活性(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2 \div (V1 \div V \times 500) \div T \\ &= 0.145 \times \Delta A \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

酶活性定义：在 50°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。

$$\text{果胶裂解酶 (PL) 活性(nmol/min/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2 \div V1 \div T = 72.46 \times \Delta A$$

ϵ ---不饱和半乳糖醛酸摩尔消光系数：4600L/mol/cm； d---比色皿光径，1cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---反应体系中上清液体积，0.1mL；

V2---反应总体积，1×10⁻³L；

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；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。