

果胶裂解酶 (pectinate lyases, PL) 试剂盒说明书

(货号: G0702W 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 15-30min。

③ 在 96 孔板 (UV 板) 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, 于 235nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (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 小于 0.01, 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。

果胶裂解酶(PL)活性(nmol/min/mg prot)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2 \div (V_1 \times Cpr) \div T = 193.2 \times \Delta A \div Cpr$

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。

果胶裂解酶(PL)活性(nmol/min/g 鲜重)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2 \div (V_1 \div V \times W) \div T = 193.2 \times \Delta A \div W$

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。

果胶裂解酶(PL)活性(nmol/min/10⁴ cell)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2 \div (V_1 \div V \times 500) \div T = 0.39 \times \Delta A$

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。

果胶裂解酶(PL)活性(nmol/min/mL)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2 \div V_1 \div T = 193.2 \times \Delta A$

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, 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。