

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°C保存 |
| 试剂一 | 液体 12mL×1 瓶 | 4°C保存 |
| 试剂二 | 液体 12mL×1 瓶 | 4°C保存 |
| 试剂三 | 液体 12mL×1 瓶 | 4°C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°C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°C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°C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°C反应 30min | | |
| 试剂三 | 60 | 60 |
| 混匀, 于 235nm 处读取吸光值 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 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)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2 \div (V1 \times Cpr) \div T = 193.2 \times \Delta A \div Cpr$

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)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2 \div (V1 \div V \times W) \div T = 193.2 \times \Delta A \div W$

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/10 4 cell)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2 \div (V1 \div V \times 500) \div T = 0.39 \times \Delta A$

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)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2 \div V1 \div T = 193.2 \times \Delta A$

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，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。