

果胶裂解酶 (pectinate lyases, PL) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TDX023-48 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, 可提高水果出汁率, 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°C保存
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C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°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 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°C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°C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。

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

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。

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

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。

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

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。