

果胶裂解酶 (pectinate lyases, PL) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX023-96 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度
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、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板 (UV 板)、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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 液体样本: 直接测定。若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 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。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min (等仪器过自检程序亦可), 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:

试剂组分 (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 150μL 于 96 孔板 (UV 板) 测定 235nm 处吸光值 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 10μL 则用 10μL 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 40μL 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、按照样本质量计算：

酶活性定义：在 50℃，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。

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

2、酶活性定义：在 50℃，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。

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

3、按液体体积计算：

酶活性定义：在 50℃，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。

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

4、按细菌/细胞密度计算：

单位定义：在 50℃，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。

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

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，2×10⁻⁴L；

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。