

果胶裂解酶（pectinate lyases, PL）试剂盒说明书

(货号: BP10414F 紫外法 48 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 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、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)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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 紫外分光光度计预热 30min (等仪器过自检程序亦可), 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:

试剂组分 (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 V_1 (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 V_1 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°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。

$$\text{果胶裂解酶 (PL) 活性(nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2 \div (V_1 \div V \times W) \div T \\ = 72.46 \times \Delta A \div W$$

2、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。

$$\text{果胶裂解酶 (PL) 活性(nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2 \div (V_1 \times C_{pr}) \div T \\ = 72.46 \times \Delta A \div C_{pr}$$

3、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。

$$\text{果胶裂解酶 (PL) 活性(nmol/min/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2 \div V_1 \div T = 72.46 \times \Delta A$$

4、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。

$$\text{果胶裂解酶 (PL) 活性(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2 \div (V_1 \div V \times 500) \div T \\ = 0.145 \times \Delta A$$

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;

V_1 ---反应体系中上清液体积, 0.1mL;

V_2 ---反应总体积, 1 $\times 10^{-3}$ L;

W ---样本质量, g;

T ---反应时间, 30min;

500---细菌或细胞总数, 万;

C_{pr} ---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。