

果胶裂解酶 (pectinate lyases, PL) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

果胶裂解酶 (EC4.2.2.10) 是果胶酶的重要组成部分，是一种能降解植物细胞壁，导致植物组织软化甚至死亡的解聚酶，来源比较广泛，主要来源于微生物，可用于果汁、果酒的澄清，提高水果出汁率，植物病毒的纯化，纸浆的漂白和纺织品的生物精炼，在减少环境污染和降低能源消耗方面具有潜在的应用价值。

测定原理：

果胶裂解酶作用于果胶中的 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。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、紫外分光光度计、1 mL 石英比色皿、恒温水浴锅。

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存。

酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。10000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 10000g，4℃ 离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 培养液：直接测定。

测定操作表：

	对照管	测定管
试剂一 (μL)		600
试剂二 (μL)	600	
40℃ 温育 3min		
酶液 (μL)	100	100
混匀，40℃ 反应 30min		
试剂三 (μL)	300	300
混匀，对照管调零，1mL 石英比色皿测定 235nm 处吸光值 A。		

酶活性计算公式:

1. 组织中 PL 活性

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在 40°C, pH5.5 条件下, 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。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/mg prot)} &= A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 64.1 \times A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 40°C, pH5.5 条件下, 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。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times W \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 64.1 \times A \div W \end{aligned}$$

2. 细胞 PL 活性

酶活性定义: 在 40°C, pH5.5 条件下, 每 10⁴ 个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。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{细胞数量} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 64.1 \times A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3. 培养液 PL 活性

酶活性定义: 在 40°C, pH5.5 条件下, 每毫升培养液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。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/mL)} &= A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ &= 64.1 \times A \end{aligned}$$

ϵ : 不饱和半乳糖醛酸摩尔消光系数: 5200L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应总体积, 1mL; V 样: 反应体系中样本体积, 0.1mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr : 样本蛋白浓度, mg/mL; W , 样本质量, g; T : 反应时间, 30min