

果胶裂解酶（pectinate lyases, PL）试剂盒说明书

微量法100T/48S

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/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板（UV板）、恒温水浴锅。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体6mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体6mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：液体6mL×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（10⁴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

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至235nm，蒸馏水调零。
2. 操作表

	对照管	测定管
试剂一（ μ L）		120
试剂二（ μ L）	120	
40℃温育3min		

酶液 (μL)	20	20
混匀, 40°C反应30min		
试剂三 (μL)	60	60
混匀于微量石英比色皿/96孔板 (UV板) 测定235nm处吸光值A, ΔA=A测定管-A对照管。		

酶活性计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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

(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。

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

2. 细菌、真菌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。

$$\begin{aligned} \text{PL活性 (nmol/min/104cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 64.1 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

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

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, 0.2mL; V样: 反应体系中样本体积, 0.02mL; 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

b. 用96孔板测定的计算公式如下

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。

$$\begin{aligned} \text{PL活性 (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 128.2 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{PL活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 128.2 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

2. 细菌、真菌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。

$$\begin{aligned} \text{PL活性 (nmol/min/104cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 128.2 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{PL活性 (nmol/min/mL)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 128.2 \times \Delta A \end{aligned}$$

ϵ : 不饱和半乳糖醛酸摩尔消光系数: 5200L/mol/cm; d : 比色皿光径, 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; W , 样本质量, g; T : 反应时间, 30min