

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（ 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：

- 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（ μ L）	20	20
混匀，40℃ 反应 30min		
试剂三（ μ L）	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， $\Delta A=A$ 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℃，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。

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

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义：在 40℃，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℃，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。

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

3. 培养液 PL 活性

酶活性定义：在 40℃，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℃，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。

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

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义：在 40℃，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℃，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。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 128.2 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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