

果胶裂解酶（PL）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: AC10479

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存

溶液的配制:

试剂一: 溶液中如果有沉淀存在, 可以 50°C水浴助溶。

产品说明:

果胶裂解酶 (EC4.2.2.10) 是果胶酶的重要组成部分, 催化果胶分子链的消除裂解。来源比较广泛, 主要来源于微生物, 在食品加工工业中提高果汁产量方面有重要意义, 在减少环境污染和降低能源消耗方面也具有潜在的应用价值。

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, 测定235nm下吸光度的上升来表示果胶裂解酶的活性。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、台式离心机、恒温水浴锅、1mL石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

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°C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°C离心 10min, 取上清置于冰上待测。
3. 培养液: 直接测定。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 235nm, 蒸馏水调零。
- 2、操作表: (在 1.5mL 离心管中)

试剂名称	测定管	空白管
试剂一 (μ L)	900	900
酶液 (μ L)	100	-
蒸馏水 (μ L)	-	100

充分混匀后测定 235nm 下的初始值 A1, 40°C 反应 30min 后再次测定吸光值 A2, 计算 ΔA 测定管=A2 测定管-A1 测定管, ΔA 空白管= A2 空白管-A1 空白管, $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管。

三、果胶裂解酶活性计算

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。

$$\text{PL 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 64.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{PL 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 64.1 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细菌、真菌数量计算

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。

$$\text{PL 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T = 64.1 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4. 按照培养液体积计算

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。

$$\text{PL 活性 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 64.1 \times \Delta A$$

ϵ : 不饱和半乳糖醛酸摩尔消光系数: 5200 L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.001L; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.1mL; $V_{\text{样总}}$: 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; 10^9 : 换算系数, 1mol=10⁹nmol。

注意事项:

- 1、若 ΔA 大于 0.5，将粗酶液用蒸馏水稀释后再进行测定。若 A 测定管大于 1.5 时，建议将样本用蒸馏水稀释后再进行测定。
- 2、建议一次测定不要测定过多样本以免耽误过多的酶促反应时间。
- 3、空白管正常情况下变化不超过 0.02。

实验实例:

- 1、取 0.1g 香蕉皮加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。之后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定管 = A2 测定 - A1 测定 = 0.43 - 0.421 = 0.009，按样本质量计算酶活得：

$$\text{PL 活性 (U/g 质量)} = 64.1 \times \Delta A \div W = 5.526 \text{ U/g 质量。}$$

- 2、取适量大肠杆菌(500 万)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, 之后按照测定步骤操作, 测得计算 ΔA 测定管 = A2 测定 - A1 测定 = 1.352 - 0.923 = 0.429, 按照细菌、真菌数量计算:

$$\text{PL 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = 64.1 \times \Delta A \div \text{细胞数量} = 263.4 \text{ U/10}^4 \text{ cell。}$$