

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, 提高水果榨汁率, 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, $\Delta A = A_{测定管} - A_{对$		

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℃，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