

## 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  $\alpha$ -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（ $\mu$ L）   |     | 120 |
| 试剂二（ $\mu$ L）   | 120 |     |
| 40℃ 温育 3min   |     |     |
| 酶液（ $\mu$ L）  | 20  | 20  |
| 混匀，40℃ 反应 30min   |     |     |
| 试剂三（ $\mu$ 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 10<sup>4</sup> 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。

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

$\epsilon$ : 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 10<sup>4</sup> 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。

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

$\epsilon$ : 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;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL;  $W$ , 样本质量, g;  $T$ : 反应时间, 30min