



果胶裂解酶活性检测试剂盒

PL Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号: AK500U

产品规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES500	50mL×1 瓶	4℃保存
AK500-A	15mL×1 瓶	4℃保存
AK500-B	15mL×1 瓶	4℃保存
AK500-C	15mL×1 瓶	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 果胶裂解酶 (pectinase lyases, PL, 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。

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, 测定 235nm 下吸光度的上升来表示果胶裂解酶的活性。

自备用品:

紫外分光光度计、1 mL 石英比色皿、天平、低温离心机、恒温水浴锅、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

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 ES500), 进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 细胞、细菌或真菌: 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 ES500), 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 (细菌、真菌等难以数量计算的微生物也可以称取 0.1g 细菌/真菌沉淀来 进行前处理)。
3. 细胞培养液等: 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长至 235nm, 蒸馏水调零。
2. 操作表 (在 EP 管中依次加入)

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)
AK500-A		600
AK500-B	600	
40℃温育 3min		
酶液	100	100
混匀, 40℃反应 30min		
AK500-C	300	300
混匀, 对照管调零, 1mL 石英比色皿测定 235nm 处吸光值 A。		

酶活性计算公式：

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。

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

(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。

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

2. 细胞、细菌或真菌 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。

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

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。

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

注：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，1mL；V_样：反应体系中样本体积，0.1mL；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；10⁹：换算系数，1mol=10⁹nmol；N：细胞数量，以万计。