



果胶裂解酶活性检测试剂盒

PL Assay Kit

微量法

产品编号: AK500M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES500	100mL×1 瓶	4℃保存
AK500-A	6mL×1 瓶	4℃保存
AK500-B	6mL×1 瓶	4℃保存
AK500-C	6mL×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 (pectinolytic enzymes, 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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、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

- 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。
- 细胞、细菌或真菌: 按照细胞数量 (10⁴ 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)。
- 细胞培养液等: 直接检测。

测定步骤:

- 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 235nm, 蒸馏水调零。
- 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		120
AK500-B	120	
40℃温育 3min		
酶液	20	20
混匀, 40℃反应 30min		
AK500-C	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, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

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。

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

(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。

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

2. 细胞、细菌或真菌 PL 活性

酶活性定义：在 40℃, pH5.5 条件下, 每 10^4 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。

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

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。

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

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, 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; 10^9 : 换算系数, 1mol=10⁹nmol; N : 细胞数量, 以万计。

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。

$$\text{PL 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 128.2 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{PL 活性 (U/g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 128.2 \times \Delta A \div W$$

2. 细胞、细菌或真菌 PL 活性

酶活性定义：在 40℃, pH5.5 条件下, 每 10^4 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。

$$\text{PL 活性 (U/10^4 cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T = 128.2 \times \Delta A \div N$$

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。

$$\text{PL 活性 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 128.2 \times \Delta A$$

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, 0.5cm; 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; C_{pr}: 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。