



果胶裂解酶（PL）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号: BC2645

规格: 100T/96S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 120 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

1. 工作液：将试剂一倒入试剂二于 50℃水浴中溶解（期间可拿出振荡数次）。该试剂易长菌，配制完成后可-20℃分装保存，可保存 12 周。

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/酶标仪、台式离心机、恒温水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、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℃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 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。（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. 培养液：直接测定。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 235nm，蒸馏水调零。

2、操作表:

试剂名称	测定管	空白管
工作液 (μL)	180	180
样本 (μL)	20	-
蒸馏水 (μL)	-	20

混匀同时按下计时器, 测定 10s 时 235nm 下的初始值 A1, 40°C反应 30min 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。空白管只需做 1-2 次。

三、果胶裂解酶活性计算

A、按微量石英比色皿计算:

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在 40°C, 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°C, 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。

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

1. 按照细菌、真菌细胞数量计算

酶活性定义: 在 40°C, 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。

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

3. 按照培养液体积计算

酶活性定义: 在 40°C, 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, 0.0002 L; $V_{\text{样}}$: 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; 10⁹: 换算系数, 1mol=10⁹nmol; N : 细胞数量, 以万计。

B、按 96 孔 UV 板计算:

将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 修改为 $d=0.6\text{cm}$ (96 孔板光径) 进行计算即可。

注意事项:

- 1、若 A1 测定管大于 1.5 或者 ΔA 大于 0.5, 将样本粗酶液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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。之后按照测

定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管= A2 测定管-A1 测定管=0.528-0.5254=0.0026， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.1551-0.1542=0.0009，按样本质量计算酶活得：

PL 活性 (U/g 质量) = $64.1 \times \Delta A \div W = 1.090$ U/g 质量。

2、取 0.1g 大肠杆菌沉淀加入 1mL 提取液冰浴超声波破碎细胞，然后 10000g，4°C离心 10min，取上清置于冰上，之后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管= A2 测定管-A1 测定管=1.2213-0.8277=0.3936， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.1551-0.1542=0.0009，按照样本质量计算酶活得：

3、PL 活性 (U/g 质量) = $64.1 \times \Delta A \div W = 251.721$ U/g 质量。

相关系列产品：

BC2630/BC2635 果胶酶活性检测试剂盒

BC3680/BC3685 原果胶含量检测试剂盒

BC4150/BC4155 离子结合型果胶 (ISP) 含量检测试剂盒

BC2660/BC2665 多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 活性检测试剂盒