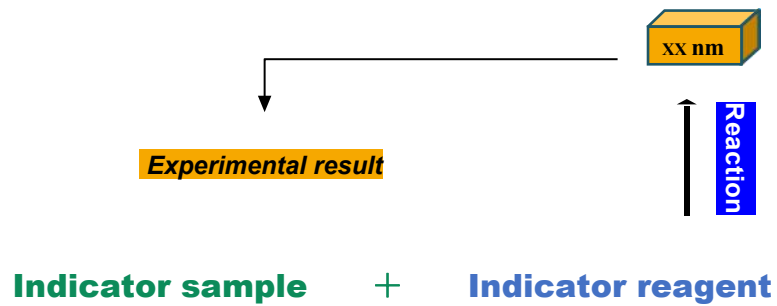


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

果胶裂解酶检测试剂盒说明书

可见分光光度法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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。

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、1mL石英比色皿、恒温水浴锅。

试剂组成和配制

| 种类 | 试剂规格 | 储存条件 | 使用方法及注意事项 |
|-----|-------------|------|-----------|
| 提取液 | 液体 50mL×1 瓶 | 4℃保存 | - |
| 试剂一 | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃保存 | - |
| 试剂二 | 液体 15mL×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

| | 对照管 | 测定管 |
|------------------------------------|-----|-----|
| 试剂一（ μ L） | 600 | 600 |
| 40℃温育3min | | |
| 酶液（ μ L） | | 100 |
| 试剂二（ μ L） | 300 | |
| 混匀，40℃反应30min | | |
| 酶液（ μ L） | 100 | |
| 试剂二（ μ L） | | 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°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。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/mg prot)} &= A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 64.1 \times A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/g)} &= A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 64.1 \times A \div W \end{aligned}$$

2. 细胞PL活性

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。

$$\begin{aligned} \text{PL 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 64.1 \times A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3. 培养液PL活性

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。

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

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； $V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，1mL； $V_{\text{样}}$ ：反应体系中样本体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：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。