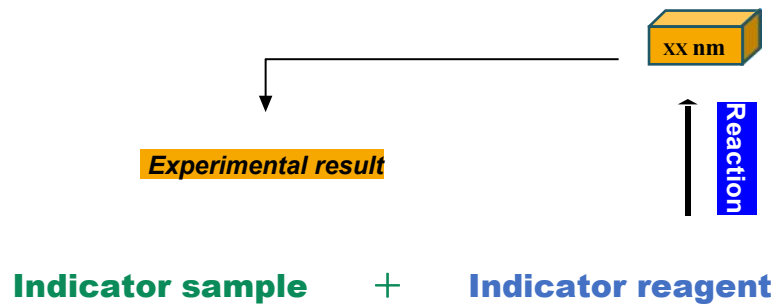


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

多聚半乳糖醛酸酶(PG)检测试剂盒说明书

微量法

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。

产品简介：

多聚半乳糖醛酸酶 (Ploygalacturonase, PG) 属果胶酶的一种, 广泛存在于植物、细菌及真菌中。其催化多聚半乳糖醛酸分解, 在果实软化、花粉授粉、种子发育成熟及器官脱落等方面具有重要作用, 并且病原菌在侵染宿主植物时, 可分泌多聚半乳糖醛酸酶来降解宿主细胞壁, 进而导致病程发展。PG 水解多聚半乳糖醛酸生成半乳糖醛酸, 半乳糖醛酸与 DNS 试剂反应生成在 540 nm 有特征吸收峰的棕红色物质, 测定 540 nm 处吸光值变化可计算得果胶酶活性。

试验中所需的仪器和试剂：

可见分光光度计/酶标仪、低温台式离心机、水浴锅、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4℃保存	若溶液中有晶体析出, 37℃水浴溶解
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	临用前加入 10 mL 蒸馏水, 60℃水浴助溶
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	半乳糖醛酸, 临用前加入 0.943 mL 蒸馏水, 配成 50 μmol/mL 的标准液。

操作步骤：

一、粗酶液提取：

组织：按照质量 (g) : 蒸馏水体积 (mL) 为 1 : 5~10 的比例 (建议称取约 0.1 g, 加入 1 mL 提取液) 加入提取液, 冰浴匀浆后于 4℃, 16000 g, 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

细菌：先收集细菌到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌数量 (10⁴ 个) : 提取液体积 (mL) 为 500~1000 : 1 的比例 (建议 500 万个细菌加入 1 mL 提取液), 冰浴超声波破碎细菌 (功率 20% 或 200 W, 超声 3 s, 间隔 7 s, 总时间 5 min); 然后 4℃, 16000 g, 离心 10 min 取上清置于冰上待测。

液体：直接检测或用提取液稀释后检测。

二、测定步骤：

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 540 nm，蒸馏水调零。
- 2、将 50 μmol/mL 标准液稀释为 6、5、4、3、2、1.5 μmol/mL 的标准溶液备用。
- 3、操作表：（在 1.5mL 离心管中）

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管	标准管
样本	25	25	-	-
蒸馏水	-	-	25	-
标准溶液	-	-	-	25
试剂一	50	50	50	50
试剂二	50	-	50	50

40°C 水浴准确反应 2 h 后，沸水浴加热 10 min（盖紧，防止水分散失），取出后冷却至室温。

试剂二	-	50	-	-
试剂三	125	125	125	125

沸水浴加热 5 min（盖紧，防止水分散失），取出后冷却至室温。

吸取 200 μL 反应液，测定 540 nm 处的吸光度，记为 A 测定管、A 对照管、A 空白管、A 标准管，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

三、PG 酶活计算：

1、标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y = kx + b$ ，将 ΔA 带入方程得到 x (μmol/mL)

2、PG 酶活的计算：

1 按蛋白浓度计算

酶活定义：在 40°C，pH 6.0 的条件下，每毫克蛋白每小时分解多聚半乳糖醛酸产生 1 μmol 的半乳糖醛酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{PG 酶活 (U / mg prot)} = x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.5x \div C_{\text{pr}}$$

2 按样本质量计算

酶活定义：在 40°C，pH 6.0 的条件下，每克样品每小时分解多聚半乳糖醛酸产生 1 μmol 的半乳糖醛酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{PG 酶活 (U / g 鲜重)} = x \times V_{\text{提取}} \div W \div T = 0.5x \div W$$

3 按照细菌数量计算

酶活定义：在 40°C，pH 6.0 的条件下，每 10⁴ 个细菌每小时分解多聚半乳糖醛酸产生 1 μmol 的半乳糖醛酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{PG 酶活 (U / 10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{提取}} \div T \div \text{细菌数量 (万个)} = 0.5x \div \text{细菌数量 (万个)}$$

4 按液体体积计算

酶活定义：在 40°C，pH 6.0 的条件下，每 mL 样本每小时分解多聚半乳糖醛酸产生 1 μmol 的半乳糖醛酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{PG 酶活 (U / mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.5x$$

V 提取：加入提取液体积，1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V 样：反应体系中样本体积，0.025 mL；T：酶促反应时间，2 h。

四、注意事项

- 1、样本提取上清液置于冰上待测，且样本提取完成后建议当天提取当天内测完。
- 2、当 A 大于 2 时，建议将样品用提取液稀释后再进行测定，并在计算公式中乘以相应稀释倍数。
- 3、植物果实组织建议将样本稀释 10 倍或 20 倍后再测定。
- 4、若样本 ΔA 值偏小，建议延长酶促反应时间，并在计算公式中除以相应时间。