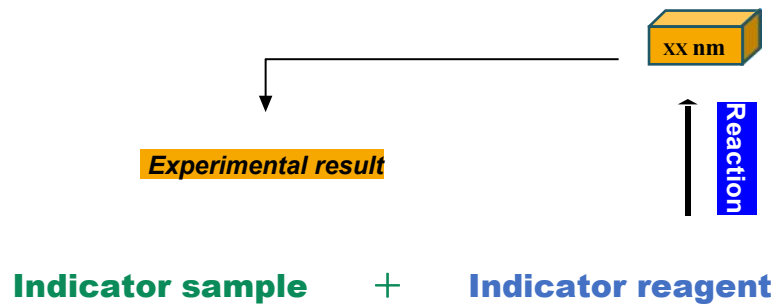


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

多聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase, PG) 试剂盒说明书

分光光度法

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。

测定意义

多聚半乳糖醛酸酶 (EC3. 2. 1. 15) 是一种细胞壁结合蛋白，可以催化果胶分子中 α -(1, 4)-聚半乳糖醛酸的裂解，参与果胶的降解，使细胞壁结构解体，导致果实软化，与果实成熟、叶和花的脱落、病原体防御，细胞伸展发育以及木质化有关，在植物抗病性和食品贮藏保鲜领域具有较高的研究价值。

多聚半乳糖醛酸酶水解果胶酸生成半乳糖醛酸，具有还原性醛基，与DNS试剂反应生成红棕色物质，在540nm有特征吸收峰，测定540nm处吸光值变化可计算得多聚半乳糖醛酸酶活性。

自备实验用品及仪器

天平、低温离心机、可见分光光度计、1 mL玻璃比色皿、恒温水浴锅。

试剂的组成和配制：

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20mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	液体25mL×1瓶	4℃避光保存	

操作步骤：

一、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。16000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2 细菌、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16000g，4℃离心10min，取上清置于冰上待测。

3培养液：直接检测。

二、测定操作表

	对照管	测定管
样本 (μL)		100
煮沸样本 (μL)	100	
试剂一 (μL)	400	400
40℃水浴30min		
试剂二 (μL)	500	500

沸水浴5min, 冰浴或自来水冷却, 蒸馏水调零, 1mL玻璃比色皿测定540nm处吸光值A,
 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

三、酶活性计算公式

标准曲线: $y = 0.1544x - 0.1537$, $R^2 = 0.9996$

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在 40°C, pH6.0 条件下, 每毫克蛋白每小时分解果胶酸产生 1mg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PG 活性 (mg/h/mg prot)} &= (\Delta A + 0.1537) \div 0.1544 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 129.53 \times (\Delta A + 0.1537) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 40°C, pH6.0 条件下, 每克样本每小时分解果胶酸产生 1mg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PG 活性 (mg/h/g)} &= (\Delta A + 0.1537) \div 0.1544 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 129.53 \times (\Delta A + 0.1537) \div W \end{aligned}$$

(3) 按液体体积计算

酶活性定义: 在 40°C, pH6.0 条件下, 每毫升培养液每小时分解果胶酸产生 1mg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PG 活性 (mg/h/mL)} &= (\Delta A + 0.1537) \div 0.1544 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 129.53 \times (\Delta A + 0.1537) \end{aligned}$$

(4) 按细胞数量计算

酶活性定义: 在 40°C, pH6.0 条件下, 每 10^4 个细胞每小时分解果胶酸产生 1mg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PG 活性 (mg/h/}10^4\text{cell)} &= (\Delta A + 0.1537) \div 0.1544 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 129.53 \times (\Delta A + 0.1537) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

V 反总: 反应总体积, 1mL; V 样: 反应中样本体积, 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, 0.5h。

注意事项

- 1 测定之前请先做预实验, 如果吸光值较高或较低, 请用提取液做适当的稀释或者加大样本量, 并在计算公式中乘以稀释倍数或者以实际加入的样本体积参与计算。

煮沸样本建议将样本在沸水中煮沸 10 分钟, 以将酶彻底灭活。