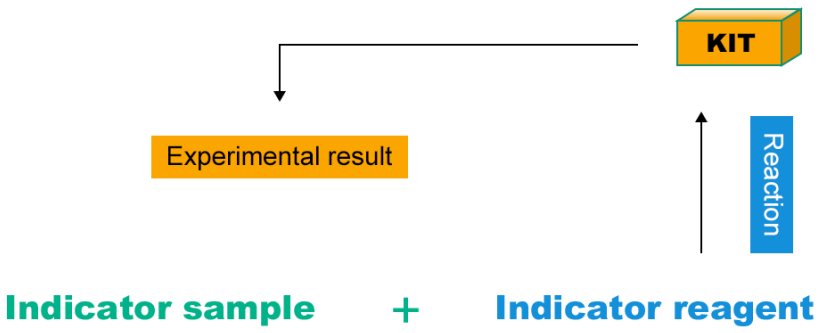
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0515 Size：100T/48S

多聚半乳糖醛酸酶(PG)检测试剂盒说明书

微量法

***正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

一、测定意义：

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。

二、测定原理：

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 540nm 处吸光值变化可计算得果胶酶活性。

三、需自备的仪器和用品：

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。

四、试剂的组成和配置：

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。

五、操作步骤：

- 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（10^4 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。

- **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℃水浴准确反应 2h 后，沸水浴加热 10min(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 5min（盖紧，防止水分散失），取出后冷却至室温。
吸取 200μL 反应液，测定 540nm 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ΔA=A 测定管-A 对照管，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。每个测定管需设一个对照管。

六、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℃，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 1μmol 的半乳糖醛酸定义为一个酶活力单位。

PG 酶活（U / mg prot）= x×V 提取÷（V 提取×Cpr）÷T = 0.5x÷Cpr

（2）按样本质量计算

酶活定义：在 40℃，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 1μmol 的半乳糖醛酸定义为一个酶活力单位。

PG 酶活（U /g 鲜重）= x×V 提取÷W÷T = 0.5x÷W

（3）按照细菌数量计算

酶活定义：在 40℃，pH 6.0 的条件下，每 10^4 个细菌每小时分解多聚半乳糖醛酸产生 1μmol 的半乳糖醛酸定义为一个酶活力单位。

PG 酶活（U /10^4cell）= x×V 提取÷T÷细菌数量（万个）=0.5x÷细菌数量（万个）

（4）按液体体积计算

酶活定义：在 40℃，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。

PG 酶活（U / mL）= x×V 样÷V 样÷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。

七、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。植物果实组织建议将样本稀释 10 倍或 20 倍后再测定。
3. 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。