

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-S0800

Size: 50T/24S

多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 检测试剂盒说明书

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

一、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、病原物防御, 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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

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。

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 50mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 20mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 25mL × 1 瓶	4°C 避光保存	

五、操作步骤：

● 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（ 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 16000g，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 培养液：直接检测。

● 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， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

六、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℃，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。

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

$$= 129.53 \times (\Delta A + 0.1537) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

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

$$= 129.53 \times (\Delta A + 0.1537) \div W$$

(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。

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

(4) 按细胞数量计算

酶活性定义：在 40°C，pH6.0 条件下，每 10⁴ 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。

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

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。

七、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。
2. 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。