

多聚半乳糖醛酸酶（poygalacturonase, PG）试剂盒说明书

微量法 100T/48S

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。

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。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 8mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 15mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

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。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（ μ L）		30
煮沸样本（ μ L）	30	
试剂一（ μ L）		120
蒸馏水	120	
40℃ 水浴 30min		
试剂二（ μ L）	150	150

沸水浴 5min, 冰浴或自来水冷却, 取 200 μ L 于微量石英比色皿/96 孔板测定 540nm 处吸光值 A, $\Delta A=A$ 测定管-A 对照管。每个测定管设一个对照管。

酶活性计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 3.9642x - 0.008$; $R^2 = 0.9996$; x 为标准品浓度, mg/mL; y 为吸光值。

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在 40 $^{\circ}$ 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。

$$\begin{aligned} \text{PG 活性 (mg/h/mg prot)} &= (\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 40 $^{\circ}$ 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。

$$\begin{aligned} \text{PG 活性 (mg/h/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div W \end{aligned}$$

3. 按液体体积计算

酶活性定义: 在 40 $^{\circ}$ 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。

$$\text{PG 活性 (mg/h/mL)} = (\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 2.523 \times (\Delta A + 0.008)$$

4. 按细胞数量计算

酶活性定义: 在 40 $^{\circ}$ 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。

$$\begin{aligned} \text{PG 活性 (mg/h/10}^4\text{cell)} &= (\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

V 反总: 反应总体积, 0.15mL; V 样: 反应中样本体积, 0.03mL; 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

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 1.9821x - 0.008$, $R^2 = 0.9996$; x 为标准品浓度, mg/mL; y 为吸光值。

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在 40 $^{\circ}$ 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。

$$\begin{aligned} \text{PG 活性 (mg/h/mg prot)} &= (\Delta A + 0.008) \div 1.9821 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 5.045 \times (\Delta A + 0.008) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 40 $^{\circ}$ 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 (U)。

$$\begin{aligned} \text{PG 活性 (mg/h/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.008) \div 1.9821 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 5.045 \times (\Delta A + 0.008) \div W \end{aligned}$$

3. 按液体体积计算

酶活性定义: 在 40 $^{\circ}$ 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 (U)。

$$\text{PG 活性 (mg/h/mL)} = (\Delta A + 0.008) \div 1.9821 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 5.045 \times (\Delta A + 0.008)$$

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（U）。

$$\text{PG 活性 (mg/h/10}^4\text{cell)} = (\Delta A + 0.008) \div 1.9821 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 5.045 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{细胞数量}$$

V 反总：反应总体积，0.15mL；V 样：反应中样本体积，0.03mL；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：

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。