

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

(货号: G0701W 微板法 96 样)

一、产品简介:

果胶酶是指分解果胶的多种酶, 主要包括多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶裂解酶(PL)、果胶甲酯酶(PME)和原果胶酶, 贮藏过程中起作用的主要是 PG。所以该酶在食品贮藏保鲜和植物抗病性等领域具有较高的研究价值。

果胶在多聚半乳糖醛酸酶(PG)作用下, 能水解产生带有具有还原性醛基的半乳糖醛酸。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。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、天平、可调式移液器、恒温水浴锅、研钵、冰。

四、多聚半乳糖醛酸酶(PG)的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液, 涡旋混匀, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 10min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。

② 细菌/培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入:

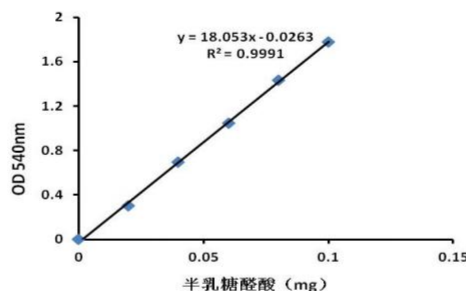
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	130	
试剂二		130
40℃水浴 30min		

试剂三	150	150
沸水浴 (95-100℃) 5min, 冰浴或淋浴冷却后, 取 200μL 于 96 孔板中, 540nm 处测定吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (每个测定管设一个对照管)。		

【注】若 ΔA 在零附近徘徊, 可增加样本上样量 V_1 (如增加至 50μL, 则试剂一或二相应减少), 或延长反应时间 T (如增至 1h), 则改变后的 V_1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 18.053x - 0.0263$; x 为标准品质量, mg; y 为 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算:

酶活定义: 在 40℃, 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。

PG 活性(mg/h/mg prot)=[$(\Delta A + 0.0263) \div 18.053$] $\div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 5.54 \times (\Delta A + 0.0263) \div C_{pr}$

3、按照样本质量计算:

酶活定义: 在 40℃, 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)。

PG 活性(mg/h/g 鲜重)=[$(\Delta A + 0.0263) \div 18.053$] $\div (V_1 \div V \times W) \div T = 5.54 \times (\Delta A + 0.0263) \div W$

4、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 在 40℃, 每 1 万个细菌或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)。

PG 活性(mg/h/10⁴ cell)=[$(\Delta A + 0.0263) \div 18.053$] $\div (V_1 \div V \times 500) \div T = 0.011 \times (\Delta A + 0.0263)$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 在 40℃, 每毫升液体每小时分解果胶酸产生 1mg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位

PG 活性(mg/h/mL)=[$(\Delta A + 0.0263) \div 18.053$] $\div V_1 \div T = 5.54 \times (\Delta A + 0.0263)$

V---加入提取液体积, 1mL;

V_1 ---反应中样本体积, 0.02mL;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 0.5h;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

C_{pr} ---样本蛋白浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液(10mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 的蒸馏水 (母液需在两天内用且-20℃保存)。
- 2 把母液稀释成五个浓度梯度的标准品: 0, 1, 2, 3, 4, 5.mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。