

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

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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 $\alpha$ -(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。

### 试剂组成和配制：

产品名称	PCS011-50T/24S	Storage
提取液：液体	50ml	4°C
试剂一：液体	20ml	4°C
试剂二：液体	25ml	4°C避光
说明书	一份	

### 自备仪器和用品：

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。

### 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°C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°C离心 10min，取上清置于冰上待测。

3、培养液：直接检测。

### 测定步骤：

	对照管	测定管
样本 ( $\mu$ l)		100

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司，保留一切权利



煮沸样本 (μl)	100	
试剂一 (μl)		400
蒸馏水 (μl)	400	
40°C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, ΔA=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:

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°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°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°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°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。

$$\begin{aligned} \text{PG 活性 (mg/h/104cell)} &= (\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$ : 反应总体积, 0.5ml;  $V_{\text{样}}$ : 反应中样本体积, 0.1ml;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1ml;  $C_{\text{pr}}$ : 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。

