

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

### 微量法 100T/48S

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。

#### 组成:

产品名称	PCS012-100T/48S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	8ml	4°C
试剂二: 液体	15ml	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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、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。

#### 测定操作表:

	对照管	测定管
样本 ( $\mu$ l)		30

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)	30	
试剂一 (μl)		120
蒸馏水	120	
40°C水浴 30min		
试剂二 (μl)	150	150
沸水浴 5min, 冰浴或自来水冷却, 取 200μl 于微量石英比色皿/96 孔板测定 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。		

**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。

**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°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 10<sup>4</sup> 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°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。

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

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



$$= 5.045 \times (\Delta A + 0.008) \div C_{pr}$$

## 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 (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°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)。

$$\begin{aligned} \text{PG 活性 (mg/h/104cell)} &= (\Delta A + 0.008) \div 1.9821 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 5.045 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

