

多聚半乳糖醛酸酶（PG）检测试剂盒（微量法）

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。

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：

- 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。
- 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。
- 培养液：**直接检测。

测定步骤表：

	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℃，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。

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

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：在 40℃，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℃，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℃，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，R² = 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℃，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。

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

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：在 40℃，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)。

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

3. 按液体体积计算

酶活性定义：在 40℃，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℃，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)。

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

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

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。