



多聚半乳糖醛酸酶活性检测试剂盒

PG Assay Kit

分光光度法

产品编号: AK501V

产品规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

| 编号 | 规格 | 储存条件 |
|-----------|----------|---|
| ES501 | 25mL×1 瓶 | 4℃保存 |
| AK501-A | 30mL×1 瓶 | 4℃保存 |
| AK501-B | 35mL×1 瓶 | 4℃避光保存 |
| AK501-标准品 | 粉剂×1 支 | 4℃保存; 临用前加入 0.943 mL 蒸馏水, 配成 50umol/mL 的标准品 |

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 多聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase, PG, 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计、1ml 玻璃比色皿、天平、低温离心机、恒温水浴锅、冰和蒸馏水。

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 ES501), 进行冰浴匀浆; 10000g 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 ES501), 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 10000g, 4℃离心 10min, 取上清置于冰上待测。
3. 细胞培养液等: 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
2. 将 50 umol/mL 标准品用蒸馏水稀释为 6、5、4、3、2、1.5 umol/mL 的标准品备用。
3. 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。
4. 操作表 (在 EP 管中依次加入):

| 试剂名称 | 对照管(ul) | 测定管(ul) | 空白管(ul) | 标准管(ul) |
|---|---------|---------|---------|---------|
| 样本 | | 100 | | |
| 煮沸样本 | 100 | | | |
| 蒸馏水 | | | 100 | |
| 标准品 | | | | 100 |
| AK501-A | 400 | 400 | 400 | 400 |
| 40℃水浴 30min | | | | |
| AK501-B | 500 | 500 | 500 | 500 |
| 沸水浴 5min, 冰浴或自来水冷却, 取 200 μ L 于微量玻璃比色皿/96 孔板测定 540nm 处吸光值 A, 记为 A | | | | |

测定管、A 对照管、A 空白管、A 标准管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

注：每个测定管设一个对照管，空白管和标准曲线只需测定 1-2 次。

酶活性计算公式：

1. 标准曲线的绘制：

以各个标准品的浓度为 x 轴，其对应的 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y = kx + b$ ，将 ΔA 带入方程得到 x (umol/mL)。

2. 酶活计算：

(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 1umol 半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\text{PG 酶活 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times \text{Cpr}) \div T = 0.5x \div \text{Cpr}$$

(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 1umol 半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\text{PG 酶活 (U/g 鲜重)} = x \times V_{\text{提取}} \div W \div T = 0.5x \div W$$

(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 1umol 半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\text{PG 酶活 (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.5x$$

(4) 按细胞数量计算

酶活性定义：在 40℃，pH6.0 条件下，每 10^4 个细胞每小时分解果胶酸产生 1umol 半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

$$\text{PG 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{提取}} \div \text{细胞数量 (万个)} \div T = 0.5x \div \text{细胞数量 (万个)}$$

注：V 样：反应中样本体积，0.1mL；V 提取：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。