

多聚半乳糖醛酸酶（polygalacturonase, PG）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-TDX025-96 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 14mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 14mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲,则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

③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。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入：

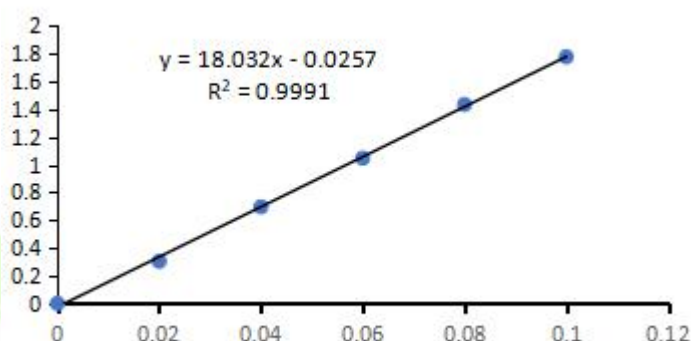
试剂组分（μL）	测定管	对照管
----------	-----	-----

样本	20	20
试剂一	130	
试剂二		130
40°C水浴 30min		
试剂三	150	150
沸水浴 (95-100°C) 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: $y = 18.032x - 0.0257$; x 为标准品质量, mg; y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

酶活定义: 在 40°C, 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)=[$(\Delta A + 0.0257) \div 18.032$] $\div (V_1 \div V \times W) \div T = 5.55 \times (\Delta A + 0.0257) \div W$

3、按照蛋白浓度计算:

酶活定义: 在 40°C, 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)=[$(\Delta A + 0.0257) \div 18.032$] $\div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 5.55 \times (\Delta A + 0.0257) \div C_{pr}$

4、按液体体积计算:

酶活定义: 在 40°C, 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)=[$(\Delta A + 0.0257) \div 18.032$] $\div V_1 \div T = 5.55 \times (\Delta A + 0.0257)$

5、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 在 40°C, 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/ 10^4 cell)=[$(\Delta A + 0.0257) \div 18.032$] $\div (V_1 \div V \times 500) \div T = 5.55 \times (\Delta A + 0.0257) \div 500$

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, 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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算；
- 2 制备标准品母液（10mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 的蒸馏水（母液需在两天内用完且 -20℃保存）；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如 0，1，2，3，4，5.mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 5 mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	1	2	3	4	5
标品稀释液 uL	0	100	120	140	160	200
蒸馏水 uL	200	100	80	60	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	20	
蒸馏水		20
试剂一	130	130
40℃水浴 30min		
试剂三	150	150
沸沸水浴（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， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		