

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

微量法 100T/48S

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。

自备实验用品及仪器

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。

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

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℃ 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℃ 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 (μ L)	30	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, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个对照管。		

注意事项

吸光值如果超过 2, 需要将上清用水适当稀释后测定, 并在计算结果中乘以相应倍数。

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。

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

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。

$$\text{PG 活性 (mg/h/g 鲜重)} = (\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div W$$

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。

$$\text{PG 活性 (mg/h/10}^4\text{cell)} = (\Delta A + 0.008) \div 3.9642 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 2.523 \times (\Delta A + 0.008) \div \text{细胞数量}$$

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。

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

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 40°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)。

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

3. 按液体体积计算

酶活性定义: 在 40°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)。

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

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