

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

（货号：G0701F 分光法 48 样）

### 一、产品简介：

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：

| 试剂名称 | 规格          | 保存要求  | 备注            |
|------|-------------|-------|---------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |               |
| 试剂一  | 液体 20mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |               |
| 试剂二  | 液体 20mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |               |
| 试剂三  | 液体 46mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |               |
| 标准品  | 粉剂 mg×1 支   | 4℃ 保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂 |

### 三、所需仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、台式离心机、天平、可调式移液器、水浴锅、研钵、冰。

### 四、多聚半乳糖醛酸酶（PG）活性检测：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### 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 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<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为 500：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

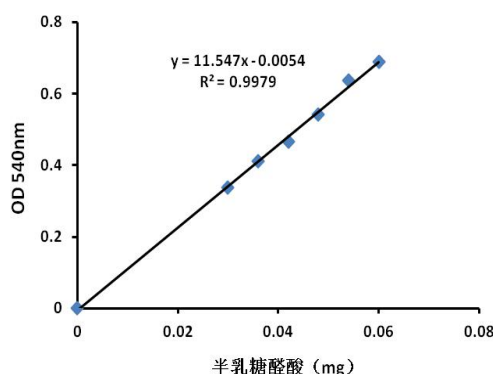
| 试剂名称（μL）     | 测定管 | 对照管 |
|--------------|-----|-----|
| 样本           | 60  | 60  |
| 试剂一          | 390 |     |
| 试剂二          |     | 390 |
| 40℃ 水浴 30min |     |     |
| 试剂三          | 450 | 450 |

沸水浴(95-100℃) 5min, 冰浴或淋浴冷却后, 全部转移于 1mL 玻璃比色皿中, 540nm 处测定吸光值 A,  $\Delta A = A$  测定管-A 对照管(每个测定管设一个对照管)。

【注】若  $\Delta A$  在零附近徘徊, 可增加样本上样量 V1 (如增加至 100 $\mu$ L, 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 V1 和 T 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线:  $y = 11.547x - 0.0054$ : x 为标准品质量, mg; y 为  $\Delta A$ 。



2、按照蛋白浓度计算:

酶活定义: 在 40℃, 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)=[ $(\Delta A + 0.0054) \div 11.547$ ] $\div (V1 \times Cpr) \div T = 2.89 \times (\Delta A + 0.0054) \div Cpr$

3、按照样本质量计算:

酶活定义: 在 40℃, 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。

PG 活性(mg/h/g 鲜重)=[ $(\Delta A + 0.0054) \div 11.547$ ] $\div (V1 \div V \times W) \div T = 2.89 \times (\Delta A + 0.0054) \div W$

4、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 在 40℃, 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。

PG 活性(mg/h/ $10^4$  cell)=[ $(\Delta A + 0.0054) \div 11.547$ ] $\div (V1 \div V \times W) \div T = 0.006 \times (\Delta A + 0.0054)$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 在 40℃, 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)=[ $(\Delta A + 0.0054) \div 11.547$ ] $\div V1 \div T = 2.89 \times (\Delta A + 0.0054)$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---反应中样本体积, 0.06mL;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 0.5h;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

Cpr---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 制备标准品母液 (10mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 的蒸馏水 (母液需在两天内用且-20℃保存)。
- 2 把母液稀释成五个浓度梯度的标准品: 0, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。