



多聚半乳糖醛酸酶活性检测试剂盒

PG Assay Kit

微量法

产品编号: AK501M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES501	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK501-A	8mL×1 瓶	4℃保存;
AK501-B	15mL×1 瓶	4℃避光保存;

※ 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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、天平、低温离心机、恒温水浴锅。

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 501~1000: 1 的比例 (建议 501 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/酶标仪预热 30min, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
2. 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。
3. 操作表 (在 EP 管中依次加入)

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)
样本		30
煮沸样本	30	
AK501-A		120
蒸馏水	120	
40℃水浴 30min		
AK501-B	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, Δ 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°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。

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

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 10^4 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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.15mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.03mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 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。

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

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 10^4 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)。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.15mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.03mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 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。