多聚半乳糖醛酸酶（ploygalacturonase，PG）试剂盒说明书
（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（10^4 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：

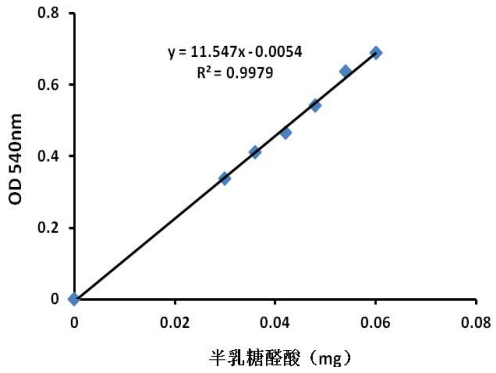
试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	60	60
试剂一	390	
试剂二		390
40℃水浴 30min		
试剂三	450	450

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，△A=A 测定管-A 对照管（每个测定管设一个对照管）。

【注】若△A 在零附近徘徊，可增加样本上样量 V1（如增加至 100μL，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△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)=[(ΔA+0.0054)÷11.547]÷(V1×Cpr)÷T=2.89×(ΔA+0.0054)÷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)=[(ΔA+0.0054)÷11.547]÷(V1÷V×W)÷T=2.89×(ΔA+0.0054)÷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)=[(ΔA+0.0054)÷11.547]÷(V1÷V×W)÷T=0.006×(ΔA+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)=[(ΔA+0.0054)÷11.547]÷V1÷T=2.89×(ΔA+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。