

多聚半乳糖醛酸反式消除酶 (Polygalacturonic acid trans-eliminase, PGTE) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

植物细胞壁是对抗病原真菌侵入的屏障,病原菌侵染植物过程中会分泌一系列细胞壁降解酶,多聚半乳糖醛酸反式消除酶是一种细胞壁降解酶,在病原菌致病过程中具有重要作用。

测定原理:

PGTE 催化多聚半乳糖醛酸反应释放出饱和醛酸,饱和醛酸在 232nm 有特征吸光值,通过测定 232nm 下吸光值增加速率反映酶活性。

需自备的仪器和用品:

酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔 UV 板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 液体 20mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 液体 3mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存; 使用前加入 2mL 试剂一, 60°C 加热震荡溶解, 用不完的试剂 4°C 保存。

粗酶液提取:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (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); 12000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

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。12000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

(1) 准备 96 孔 UV 板一块 (非普通酶标板, 普通酶标板只能透过可见光, 不能透过紫外光, 检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板)。

(2) 工作液的配制: 临用前按照样本数量, 按以下比例配制工作液

试剂名称 (μL)	测定工作液	对照工作液
试剂一	160	160
试剂二	40	
蒸馏水		40
试剂三	10	10

(3) 按下表在 96 孔板中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
测定工作液	180	
对照工作液		180

30°C 避光孵育 30min, 232nm 下测定吸光值 A 测定与 A 对照, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

PGTE 活性计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟释放 1 nmol 的不饱和醛酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{PGTE (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 145 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟释放 1 nmol 的不饱和醛酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{PGTE (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 145 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟释放 1 nmol 的不饱和醛酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{PGTE (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \div T$$

$$= 0.29 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 不饱和醛酸摩尔消光系数, 4.6×10^3 L / mol / cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.02 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 30 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。