

L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶 (Gal LDH) 试剂盒说明书

(货号: G0210W 微板法 96 样)

一、产品简介:

L-半乳糖途径是公认的植物 AsA 的主要合成途径。L-半乳糖内酯脱氢酶 (L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, GalLDH, EC1.3.2.3) 位于线粒体内膜, 直接氧化 L-半乳糖内酯 (L-galactono-1,4-lactone, Gal) 生成 AsA, 是植物 AsA 生物合成途径中最后一步关键酶。

Gal LDH 催化 L-半乳糖内酯还原细胞色素 C (Cyt c), 还原型 Cyt c 在 550nm 有吸收峰; 测定还原型 Cyt c 增加速率, 来计算 Gal LDH 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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×1 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 再加 17mL 蒸馏水, 两天内用完。
试剂二	粉剂×1 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 再加 2mL 蒸馏水, 两天内用完。

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、Gal LDH 活性测定:

1、样本制备

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 液氮研磨之后, 再加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 4℃×12000rpm, 离心 15min, 取上清置冰上待测。

2、上机检测

① 酶标仪预热 30 min, 调节波长到 550nm。

② 试剂一, 试剂二在 25℃水浴锅中预热 5 min。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称	测定管
样本	15
试剂一	170
试剂二	15
迅速混匀后于 550nm 比色, 记录 10s 和 100s 的吸光值 A1 和 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】如果 ΔA 小于 0.005, 延长反应时间到 200s 或者更长。

五、结果计算:

1、按蛋白浓度计算:

酶活定义: 25℃中每毫克蛋白每分钟还原 1 μ mol Cyt c 为 1 个酶活单位。

Gal LDH (μ mol/min/mg prot) = $[\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^6] \div (Cpr \times V1) \div T = 1.03 \times \Delta A \div Cpr$

2、按样本质量计算:

酶活定义: 25℃中每克样品每分钟还原 1 μ mol Cyt c 为 1 个酶活单位。

Gal LDH (μ mol/min/g 鲜重) = $\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^6 \div (W \times V1 \div V) \div T = 1.03 \times \Delta A \div W$

ϵ ---还原型 Cyt c 摩尔消光系数, $17.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d ---96 孔板光径(cm), 0.5cm;

V_2 ---反应体系总体积, $200 \mu\text{L} = 0.2 \text{ mL} = 0.0002 \text{ L}$;

10^6 --- $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$;

V_1 ---加入反应体系中上清液体积, $15 \mu\text{L} = 0.015 \text{ mL}$;

V ---提取液体积, 1 mL;

T ---反应时间, 1.5min。

C_{pr} ---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司蛋白质含量 BCA 蛋白含量测定试剂盒。