

L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶 (Gal LDH) 试剂盒说明书 (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的关键酶。

Gal LDH 催化 L-半乳糖内酯还原细胞色素 C(Cytc),还原型 Cytc 在 550nm 有吸收峰;测定还原型 Cytc 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	使用前甩几下或 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	使用前甩几下或 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:

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

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。

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

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。

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

$$=1.03 \times \Delta A \div W$$

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

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。