

L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶 (Gal LDH) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC1255

规格: 100T/96S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制:

1. 试剂一: 临用前加入 16 mL 蒸馏水, 充分溶解;
2. 试剂二: 临用前加入 2 mL 蒸馏水, 充分溶解。

产品说明:

L-半乳糖途径是合成AsA的主要途径。Gal LDH位于线粒体内膜, 负责催化植物体内AsA生物合成的最后一步, 也是该途径的关键酶之一, 对植物体内AsA含量的积累起着至关重要的作用。

Gal LDH催化L-半乳糖内酯还原氧化型细胞色素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。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品:

台式离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液器、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

称取约 0.1g 样本, 加提取液 1mL, 冰上充分研磨, 13000g 4℃离心 10min, 取上清液置冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热30 min, 调节波长到550nm, 蒸馏水调零。
- 2、按样本数取出一定量的试剂一在25℃水浴锅中预热30 min以上, 其余的分装保存(-20℃)。
- 3、空白管: 依次在微量比色皿/96孔板中加入20μL蒸馏水、160μL预热的试剂一和20μL试剂二, 迅速混匀后于550nm比色, 记录10s和130s的吸光值, 分别为A1, A2, $\Delta A_{\text{空白管}} = A2 - A1$ 。
- 4、测定管: 依次在微量比色皿/96孔板中加入20μL上清液、160μL预热的试剂一和20μL试剂二, 迅速混匀后于550nm比色, 记录10s和130s的吸光值, 分别为A3, A4, $\Delta A_{\text{测定管}} = A4 - A3$ 。

三、Gal LDH 活性计算

a. 使用微量比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算:

Gal LDH活性单位定义: 25℃中每毫克蛋白每分钟还原1μmol Cyt c为1个酶活单位。





$$\begin{aligned}\text{Gal LDH (U/mg prot)} &= [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 0.289 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

Gal LDH活性单位定义：25℃中每克样本每分钟还原1μmol Cyt c为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{Gal LDH (U/g 质量)} &= [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 0.289 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W\end{aligned}$$

ε: 还原型Cyt c摩尔消光系数, 17.3×10³L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V反总: 反应体系总体积, 0.2mL=0.0002L; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=1×10⁶μmol; V样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02mL; V样总: 提取液体积, 1mL; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL, 蛋白质浓度需要另外测定; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 2min。

b.使用96孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

Gal LDH活性单位定义：25℃中每毫克蛋白每分钟还原1μmol Cyt c为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{Gal LDH (U/mg prot)} &= [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 0.482 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

Gal LDH活性单位定义：25℃中每克样本每分钟还原1μmol Cyt c为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{Gal LDH (U/g 质量)} &= [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 0.482 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W\end{aligned}$$

ε: 还原型Cyt c摩尔消光系数, 17.3×10³L/mol/cm; d: 96孔板光径, 0.6cm; V反总: 反应体系总体积, 0.2mL=0.0002L; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=1×10⁶μmol; V样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02mL; V样总: 提取液体积, 1mL; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL, 蛋白质浓度需要另外测定; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 2min。

注意事项:

- 1、在测定酶活时要注意温度。建议取小烧杯一只装入一定量的 25℃蒸馏水, 将此烧杯放入 25℃水浴锅中, 在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中; 若使用 96 孔板, 反应期间应放入 25℃培养箱中。
- 2、建议两个人同时做此实验, 一个人比色, 一个人计时, 以保证实验结果的准确性。
- 3、加入最后一种试剂后需迅速混匀并测定 OD 值。

实验实例:

- 1、取 0.1g 土豆加入 1mL 提取液冰上充分研磨, 13000g 4℃离心 10min, 取上清液置冰上, 按照测定步骤操作, 用微量比色皿测得计算 ΔA 测定管=A4-A3=0.9253-0.7844=0.1409, ΔA 空白管=A2-A1=0, 按样本质量计算酶活得: Gal LDH (U/g 质量)=0.289×(ΔA 测定管-ΔA 空白管)÷W=0.4072 U/g 质量。

相关系列产品:

- BC1230/BC1235 抗坏血酸 (AsA) 含量检测试剂盒
- BC1240/BC1245 脱氢抗坏血酸 (DHA) 含量检测试剂盒
- BC0650/BC0655 单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 活性检测试剂盒

