

L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶 (Gal LDH) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-VC003 分光法 48 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 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,再加 34mL 蒸馏水,两天内用完。
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,再加 3.5mL 蒸馏水,两天内用完。

三、所需仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵。

四、Gal LDH 活性测定:

1、样本制备

称取约 0.1g 组织,液氮研磨之后,再加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆,4°C×12000rpm,离心 15min,取上清置冰上待测。

2、上机检测

- ① 分光光度计预热 30 min,调节波长到 550nm,蒸馏水调零。
- ② 试剂一,试剂二在 25°C水浴锅中预热 5 min。
- ③ 在 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中依次加入:

试剂名称	测定管
样本	60
试剂一	680
试剂二	60
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°C中每毫克蛋白每分钟还原 1 μ mol Cyt c 为 1 个酶活单位。

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

$$= 0.51 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算:

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

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

$$=0.51 \times \Delta A \div W$$

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

d ---光径(cm), 1cm;

V_2 ---反应体系总体积, $800 \mu\text{L} = 0.8 \text{mL} = 0.0008 \text{L}$;

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, $60 \mu\text{L} = 0.06 \text{mL}$;

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。