

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 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 34mL 蒸馏水, 两天内用完。
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 3.5mL 蒸馏水, 两天内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

1、样本提取

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℃×12000rpm, 离心 15min, 取上清置冰上待测。

2、检测步骤

- 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℃水浴锅中预热 5 min。
- ③ 在 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm) 中依次加入:

试剂组分	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℃中每毫克蛋白每分钟还原 1 μ mol Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$\text{Gal LDH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ = 0.51 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 μmol Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$\text{Gal LDH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^6 \div (\text{W} \times V1 \div V) \div T \\ = 0.51 \times \Delta A \div \text{W}$$

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;

V2---反应体系总体积, 800 μL = 0.8mL = 0.0008L;

10⁶---1mol = 1 $\times 10^6\mu\text{mol}$;

V1---加入反应体系中上清液体积, 60 μL = 0.06mL;

V---提取液体积, 1 mL;

T---反应时间, 1.5min。

Cpr---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。