

L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶 (Gal LDH) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

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。

测定原理:

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。

组成:

产品名称	VC006-100T/96S	Storage
试剂一: 液体	100ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂三: 粉剂	1 管	4°C
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×1 瓶 (棕色), 4°C保存。临用前加入 16ml 蒸馏水, 充分溶解。

试剂三: 粉剂×1 管, 4°C保存。临用前加入 2ml 蒸馏水, 充分溶解。

自备仪器和用品:

台式离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

照组织质量 (g) : 试剂一体积(ml)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1ml 试剂一) 进行冰浴匀浆。13000g, 4°C离心 10min, 取上清置冰上待测。

Gal LDH 测定操作:

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. 试剂二在 25°C水浴锅中预热 30 min。
3. 依次在、微量玻璃比色皿/96 孔板中加入 20μl 上清液、160μl 预热的试剂二和 20μl 试剂三, 迅速混匀后于 550nm 比色, 记录 10s 和 130s 的吸光值 A1 和 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



Gal LDH 活性计算公式：

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°C中每毫克蛋白每分钟还原 1nmol Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$\text{Gal LDH (nmol/min/mg prot)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{(C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T} \\ = 578 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2). 按样本质量计算

Gal LDH 活性单位定义：25°C中每克样品每分钟还原 1nmol Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$\text{Gal LDH (nmol/min/g 鲜重)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{(W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T} \\ = 578 \times \Delta A \div W$$

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; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $0.2\text{ml}=0.0002 \text{L}$; 10^9 : $1\text{mol}=1 \times 10^9 \text{nmol}$; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $20\mu\text{l}=0.02\text{ml}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 ml; C_{pr} : 上清液蛋白浓度, mg/ml, 蛋白质浓度需要另外测定, 建议使用本公司蛋白质含量 BCA 试剂盒; T : 反应时间, 2min。

注意事项：

试剂二和试剂三配制好后 3 天内使用完。

