

L-半乳糖苷-1,4-内酯脱氢酶(Gal LDH)活性检测试剂盒

Gal LDH Assay Kit

微量法

货号: AK269

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK269-A	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK269-B	粉剂×1 瓶 (棕色)	4℃避光保存; 临用前加入 16mL 蒸馏水, 充分溶解。
AK269-C	粉剂×1 管	4℃保存; 临用前加入 2mL 蒸馏水, 充分溶解。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: L-半乳糖-1,4-内酯脱氢酶 (L-galactose-1,4-lactone dehydrogenase, Gal LDH) 是催化植物抗坏血酸 (Ascorbic acid, AsA) 生物合成 (L-半乳糖途径) 的最后一步关键酶, 对提高植物 AsA 含量, 增强其抗逆境胁迫能力具有非常重要的作用。

原理: Gal LDH 催化 L-半乳糖内酯还原细胞色素 C (Cytochrome 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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

按照组织质量(g): AK269-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK269-A)进行冰浴匀浆。13000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

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. AK269-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。
3. 在微量玻璃比色皿/96 孔板中依次加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
上清液	20
AK269-B	160
AK269-C	20
迅速混匀后于 550nm 比色, 记录 10s 和 130s 的吸光值 A1 和 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

Gal LDH 酶活性计算公式:

a. 使用微量玻璃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。

$$\text{Gal LDH (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6}{C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \div T} = 289 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\text{Gal LDH (U/g)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 289 \times \Delta A \div W$$

注： ϵ ：还原型 Cyt c 摩尔消光系数， $17.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：比色皿光径(cm)，1cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $0.2 \text{ mL} = 0.0002 \text{ L}$ ； 10^6 ： $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：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， 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 $1 \mu\text{mol}$ Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$\text{Gal LDH (U/mg prot)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 578 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

Gal LDH 活性单位定义：25℃中每克样品每分钟还原 $1 \mu\text{mol}$ Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$\text{Gal LDH (U/g)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 578 \times \Delta A \div W$$

注： 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， $0.2 \text{ mL} = 0.0002 \text{ L}$ ； 10^6 ： $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：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， T ：反应时间，2min。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

注意事项：

AK269-B, AK269-C 配制好后 3 天内使用完。