

L-半乳糖昔-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。

$$\text{Gal LDH (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 106}{(C_{\text{Pr}} \times V_{\text{样}}) \div T} = 289 \times \Delta A \div C_{\text{Pr}}$$

(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。

$$Gal\ LDH\ (U/g) = \frac{\Delta A \times 106}{W} \times \frac{V_{反总}}{V_{样总}} \times \frac{1}{T} = 289 \times \frac{\Delta A}{W}$$

注： ϵ ：还原型 Cyt c 摩尔消光系数， $17.3 \times 10^3 L/mol/cm$; d: 比色皿光径(cm), 1cm; V 反总: 反应体系总体积, $0.2mL=0.0002\ L$; $10^6: 1mol=1\times 10^6\mu mol$; V 样: 加入反应体系中上清液体积, $20\mu L=0.02mL$; V 样总: 提取液体积, 1 mL; Cpr: 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 μmol Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$Gal\ LDH\ (U/mg\ prot) = \frac{\Delta A \times 106}{Cpr \times V} \times \frac{V_{反总}}{V_{样总}} \times \frac{1}{T} = 578 \times \frac{\Delta A}{Cpr}$$

(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 μmol Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$Gal\ LDH\ (U/g) = \frac{\Delta A \times 106}{W} \times \frac{V_{反总}}{V} \times \frac{1}{T} = 578 \times \frac{\Delta A}{W}$$

注： ϵ ：还原型 Cyt c 摩尔消光系数， $17.3 \times 10^3 L/mol/cm$; d: 96 孔板光径(cm), 0.5cm; V 反总: 反应体系总体积, $0.2mL=0.0002\ L$; $10^6: 1mol=1\times 10^6\mu mol$; V 样: 加入反应体系中上清液体积, $20\mu L=0.02mL$; V 样总: 提取液体积, 1 mL; Cpr: 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。