

L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶 (Gal LDH) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10273

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存

溶液的配制:

1. 试剂一: 临用前加入 40 mL 蒸馏水, 充分溶解;
2. 试剂二: 临用前加入 5 mL 蒸馏水, 充分溶解。

产品说明:

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。

Gal LDH催化L-半乳糖内酯还原氧化型细胞色素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。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

台式离心机、可见分光光度计、1mL玻璃比色皿、可调式移液器、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

称取约 0.1g 样本, 加提取液 1mL, 冰上充分研磨, 13000g 4°C离心 10min, 取上清液置冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min, 调节波长到550nm, 蒸馏水调零。
- 2、按样本数取出一定量的试剂一在25°C水浴锅中预热30min以上, 其余的分装保存(-20°C)。
- 3、空白管: 依次在1mL比色皿中加入100μL蒸馏水、800μL预热的试剂一和100μL试剂二, 迅速混匀后于550nm比色, 记录10s和130s的吸光值, 分别为A1, A2, ΔA 空白管=A2-A1。
- 4、测定管: 依次在1mL比色皿中加入100μL上清液、800μL预热的试剂一和100μL试剂二, 迅速混匀后于550nm比色, 记录10s和130s的吸光值, 分别为A3, A4, ΔA 测定管=A4-A3。

三、Gal LDH 活性计算

(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1μmol Cyt c为1个酶活单位。

$$\text{Gal LDH (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 0.289 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\text{Gal LDH (U/g 质量)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

$$= 0.289 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

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, 1cm ; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1\text{mL} = 0.001\text{L}$; 10^6 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $100\mu\text{L} = 0.1\text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL ; Cpr : 上清液蛋白浓度, mg/mL , 蛋白质浓度需要另外测定; W : 样本质量, g ; T : 反应时间, 2min 。

注意事项:

- 1、在测定酶活时要注意温度。建议取小烧杯一只装入一定量的 25°C蒸馏水，将此烧杯放入 25°C水浴锅中，在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
- 2、建议两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。
- 3、加入最后一种试剂后需迅速混匀并测定 OD 值。

实验实例:

- 1、取 0.1g 猕猴桃加入 1mL 提取液冰上充分研磨， 13000g 4°C 离心 10min，取上清液置冰上，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A_4 - A_3 = 0.881 - 0.784 = 0.097$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A_2 - A_1 = 0$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\text{Gal LDH (U/g 质量)} = 0.289 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W = 0.2803 \text{ U/g 质量}$ 。