

L-半乳糖苷-1,4-内脂脱氢酶 (Gal LDH) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1207

产品规格: 100管/96样

产品简介:

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。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	粉剂×1瓶	-20℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃

溶液的配制:

1. 试剂一: 临用前加入16mL蒸馏水,充分溶解;
2. 试剂二: 临用前加入2mL蒸馏水,充分溶解。

需自备的仪器和用品:

台式离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液器、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样品处理 (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℃离心10min,取上清液置冰上待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热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℃水浴锅中预热30min以上,其余的分装保存(-20℃)。
3. 空白管: 依次在微量比色皿/96孔板中加入20μL蒸馏水、160μL预热的试剂一和20μL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, $\Delta A_{\text{空白管}}=A2-A1$ 。
4. 测定管: 依次在微量比色皿/96孔板中加入20μL上清液、160μL预热的试剂一和20μL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, $\Delta A_{\text{测定管}}=A4-A3$ 。

三、Gal LDH活性计算

a.使用微量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。

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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

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

(2) 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} \text{Gal LDH (U/g 质量)} &= [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 0.289 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W \end{aligned}$$

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反总：反应体系总体积，0.2mL=0.0002L； 10^6 ：单位换算系数， $1 \text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ；V样：加入反应体系中上清液体积，20μL=0.02mL；V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。

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1μmol Cyt c为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{Gal LDH (U/mg prot)} &= [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 0.482 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} \text{Gal LDH (U/g 质量)} &= [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 0.482 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W \end{aligned}$$

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，0.6cm；V反总：反应体系总体积，0.2mL=0.0002L； 10^6 ：单位换算系数， $1 \text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ；V样：加入反应体系中上清液体积，20μL=0.02mL；V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℃蒸馏水，将此烧杯放入25℃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；若使用96孔板，反应期间应放入25℃培养箱中。
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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com