

L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶 (Gal LDH) 试剂盒说明书 (分光法 48 样)

一、产品简介：

L-半乳糖途径是公认的植物 AsA 的主要合成途径。L-半乳糖内酯脱氢酶(L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, GalDH, EC1.3.2.3)位于线粒体内膜，直接氧化 L-半乳糖内酯(L-galactono-1,4-lactone, Gal)生成 AsA，是植物 AsA 生物合成途径中最后一步的关键酶。

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。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×1 瓶	4℃保存	使用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再加 34mL 蒸馏水，两天内用完。
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	使用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再加 3.5mL 蒸馏水，两天内用完。

三、所需仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、台式离心机、可调式移液器、研钵。

四、Gal LDH 活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备

称取约 0.1g 组织，液氮研磨之后，再加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，4℃×12000rpm，离心 15min，取上清置冰上待测。

2、上机检测

- ① 分光光度计预热 30 min，调节波长到 550nm，蒸馏水调零。
- ② 试剂一，试剂二在 25℃水浴锅中预热 5 min。
- ③ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

试剂名称	测定管
样本	60
试剂一	680
试剂二	60
迅速混匀后于 550nm 比色，记录 10s 和 100s 的吸光值 A1 和 A2， $\Delta A = A2 - A1$	

【注】如果 ΔA 小于 0.005，延长反应时间到 200S 或者更长。

五、结果计算

1、按蛋白浓度计算：

酶活定义：25℃中每毫克蛋白每分钟还原 1 μ mol Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$\text{Gal LDH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T$$

$$= 0.51 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算：

酶活定义：25℃中每克样品每分钟还原 1 μ mol Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$\text{Gal LDH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^6 \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ = 0.51 \times \Delta A \div W$$

ϵ ----还原型 Cyt c 摩尔消光系数，17.3 $\times 10^3$ L/ mol/cm；

d----光径(cm)，1cm；

V2----反应体系总体积，800 μ L =0.8mL=0.0008L；

10⁶----1mol=1 $\times 10^6$ μ mol；

V1----加入反应体系中上清液体积，60 μ L=0.06mL；

V----提取液体积，1 mL；

T----反应时间，1.5min。

Cpr----上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司蛋白质含量 BCA 蛋白含量测定试剂盒。