

L-半乳糖脱氢酶 (GalDH) 活性检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-G010 分光法 24 样)

一、产品简介:

L-半乳糖脱氢酶(EC 1.1.1.316, L-galactose dehydrogenase, GalDH)是植物合成抗坏血酸 Vc 的重要酶之一, L-半乳糖脱氢酶在 C1 位直接氧化 L-半乳糖生成 Vc 合成的直接底物—L-半乳糖-1,4-内酯, 同时将 NAD⁺还原为 NADH。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: 该酶促过程产生的 NADH 与特异显色剂反应产生在 450nm 处有最大吸收峰的有色物质, 通过检测 450nm 处的增加速率, 进而计算出 GalDH 酶活性大小。

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 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 3mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂 4°C保存。
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	四 a: 粉剂 2 瓶 四 b: 液体 14mL×1 瓶	室温保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 向一瓶四 a 中加入 7mL 四 b 充分溶解, 用不完的室温保存。
标准品	粉剂 1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

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

四、L-半乳糖脱氢酶 (GalDH) 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:

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 4°C 约 12,000rpm 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min, 调节波长到 450 nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) 或于 25°C下水浴 15min 左右。

③ 在 1mL 比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

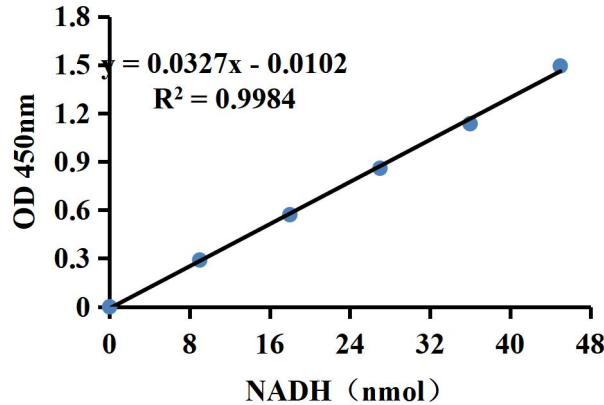
试剂名称 (μL)	测定管	对照
样本	150	150
试剂一	40	40
试剂二	40	40
试剂三	120	520
试剂四	400	

混匀，立即于 450nm 处读取 A1 值，室温静置 20min 后读取 A2 值（观察：酶活性越大，则黄色越明显）， $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 对照} - A1 \text{ 对照})$ 。

【注】：若 ΔA 小于 0.01，可以延长反应时间 T（如：40min 或更长）再读取 A2，或增加加样体积 V1（如由 150 μ L 增至 200 μ L，则试剂三相应减少）；或加大样本取样量 W（如增加到 0.2g）。重新调整的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0327x - 0.0102$ ，x 是 NADH 摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

定义：每毫克组织蛋白每小时使 1 nmol NAD⁺转换成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GalDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0102) \div 0.0327] \div (V1 \times Cpr) \div T = 611.6 \times (\Delta A + 0.0102) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

定义：每克组织每小时使 1 nmol NAD⁺转换成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GalDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0102) \div 0.0327] \div (W \times V1 \div V) \div T = 611.6 \times (\Delta A + 0.0102) \div W$$

4、按细胞数量计算：

定义：每 10⁴ 个细胞每小时使 1 nmol NAD⁺转换成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GalDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0102) \div 0.0327] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 611.6 \times (\Delta A + 0.0102) \div 500$$

5、按液体体积计算：

定义：每毫升液体每小时使 1 nmol NAD⁺转换成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GalDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0102) \div 0.0327] \div V1 \div T = 611.6 \times (\Delta A + 0.0102)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.15 mL；

T---反应时间，20 min=1/3h；

W---样本质量，g； 500---细胞数量，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（4 μ mol/mL）：向标准品 EP 管里面加入 0.7mL 蒸馏水（母液需在两天内用且 4 $^{\circ}$ C 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3 μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 150 μ L 标准品+40 μ L 试剂二+160 μ L 试剂三+400 μ L 水，混匀后室温 5min 后于 450nm 处读值，根据结果即可制作标准曲线。