

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 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 3mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂 4℃保存。
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	四 a: 粉剂 2 瓶 四 b: 液体 14mL×1 瓶	室温避光保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 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℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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℃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℃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、检测步骤：

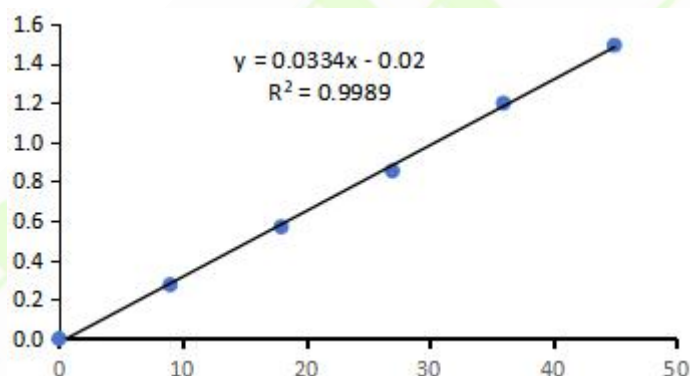
- ① 可见分光光度计预热 30min，调节波长到 450 nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）或于 25℃下水浴 15min 左右。
- ③ 在 1mL 比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（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 150μL 增至 200μL，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： $y = 0.0334x - 0.02$ ，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。

$$\text{GalDH}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.02) \div 0.0334] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 598.8 \times (\Delta A + 0.02) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{GalDH}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.02) \div 0.0334] \div (W \times V1 \div V) \div T = 598.8 \times (\Delta A + 0.02) \div W$$

4、按细胞数量计算：

定义：每 10^4 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。

$$\text{GalDH}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.02) \div 0.0334] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 598.8 \times (\Delta A + 0.02) \div 500$$

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。

$$\text{GalDH}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.02) \div 0.0334] \div V1 \div T = 598.8 \times (\Delta A + 0.02)$$

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 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℃保存），标准品母液浓度为 4μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 75uL，加入 925uL 蒸馏水，混匀得到 0.3μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	0.06	0.12	0.18	0.24	0.3
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	150	
蒸馏水		150
试剂二	40	40
试剂三	160	160
蒸馏水	400	400
混匀后室温静置 5min，于 450nm 处读值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - 0 \text{ 浓度管}$ 。		