

L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶（Gal LDH）试剂盒说明书

(货号：ADS-W-VC003 微板法 96 样 有效期：6 个月)

一、指标介绍：

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, GalLDH, 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关键酶。

Gal LDH 催化 L-半乳糖内酯还原细胞色素 C(Cytc)，还原型 Cytc 在 550nm 有吸收峰；测定还原型 Cytc 增加速率，来计算 Gal LDH 活性。

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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 17mL 蒸馏水，两天内用完。
试剂二	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2mL 蒸馏水，两天内用完。

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

1、样本提取

称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），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、检测步骤

- ① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 550nm。
- ② 试剂一，试剂二在 25℃水浴锅中预热 5 min。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分	测定管
样本	15
试剂一	170
试剂二	15
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。

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

$$= 1.03 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{Gal LDH } (\mu\text{mol/min/g 鲜重}) &= \Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^6 \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 1.03 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

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(cm), 0.5cm;

$V2$ ---反应体系总体积, $200\mu\text{L} = 0.2\text{mL} = 0.0002 \text{ L}$;

10^6 --- $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$;

$V1$ ---加入反应体系中上清液体积, $15\mu\text{L} = 0.015\text{mL}$;

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。