

L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶（Gal LDH）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

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。

自备仪器和用品：

台式离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1 瓶（棕色），4℃保存。临用前加入 16mL 蒸馏水，充分溶解。

试剂三：粉剂×1 管，4℃保存。临用前加入 2mL 蒸馏水，充分溶解。

粗酶液提取：

照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。13000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

Gal LDH 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 550nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25℃水浴锅中预热 30 min。
3. 依次在、微量玻璃比色皿/96 孔板中加入 20μL 上清液、160μL 预热的试剂二和 20μL 试剂三，迅速混匀后于 550nm 比色，记录 10s 和 130s 的吸光值 A1 和 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

Gal LDH 活性计算公式：

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 1nmol Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$\text{Gal LDH (nmol/min/mg prot)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{(C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T} \\ = 578 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2). 按样本质量计算

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

$$\text{Gal LDH (nmol/min/g 鲜重)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{(W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T} \\ = 578 \times \Delta A \div W$$

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; V 反总: 反应体系总体积, $0.2\text{mL}=0.0002 \text{L}$; 10^9 : $1\text{mol}=1 \times 10^9 \text{nmol}$; V 样: 加入反应体系中上清液体积, $20\mu\text{L}=0.02\text{mL}$; V 样总: 提取液体积, 1 mL; C_{pr} : 上清液蛋白浓度, mg/mL, 蛋白质浓度需要另外测定, 建议使用本公司蛋白质含量 BCA 试剂盒; T : 反应时间, 2min。

注意事项:

试剂二和试剂三配制好后 3 天内使用完。