

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：

L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶（Gal LDH）活性测定试剂盒说明书使用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。

$$\begin{aligned}\text{Gal LDH (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 578 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(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。

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

$$=578 \times \Delta A \div W$$

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; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $0.2 \text{ mL} = 0.0002 \text{ L}$; 10^9 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 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。