

## L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶（Gal LDH）试剂盒说明书

（货号：BP10227F 分光法 48 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, GaLDH, 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(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。

### 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 50mL×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）；<br>2. 加入 34mL 蒸馏水，两天内用完。  |
| 试剂二  | 粉剂 1 瓶      | 4℃避光保存   | 1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 3.5mL 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）、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：

#### 1、样本提取

称取约 0.1g 组织，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 分光光度计预热 30 min，调节波长到 550nm，蒸馏水调零。
- ② 试剂一，试剂二在 25℃水浴锅中预热 5 min。
- ③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

| 试剂组分                                                             | 测定管 |
|------------------------------------------------------------------|-----|
| 样本                                                               | 60  |
| 试剂一                                                              | 680 |
| 试剂二                                                              | 60  |
| 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  $\Delta A$  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 $\mu$ mol Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$\text{Gal LDH } (\mu\text{mol/min/mg prot}) = [\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^6] \div (Cpr \times V1) \div T \\ = 0.51 \times \Delta A \div Cpr$$

## 2、按样本质量计算：

酶活定义：25℃中每克样品每分钟还原 1 $\mu\text{mol}$  Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$\text{Gal LDH } (\mu\text{mol/min/g 鲜重}) = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^6 \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 0.51 \times \Delta A \div W$$

$\varepsilon$ ---还原型 Cyt c 摩尔消光系数， $17.3 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ;

$d$ ---光径(cm)，1cm;

$V2$ ---反应体系总体积， $800\mu\text{L} = 0.8\text{mL} = 0.0008\text{L}$ ;

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

$V1$ ---加入反应体系中上清液体积， $60\mu\text{L} = 0.06\text{mL}$ ;

$V$ ---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。