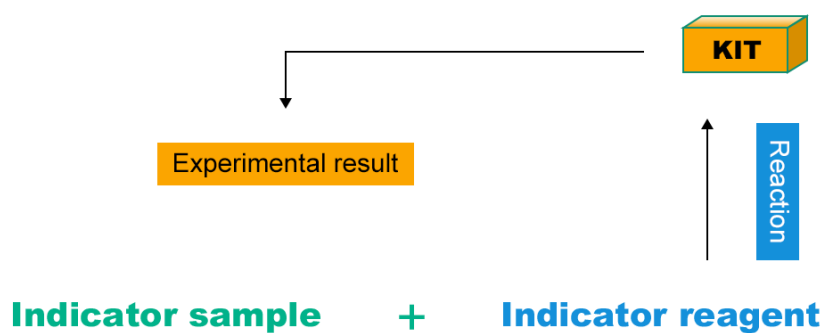


上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0338

Size: 100T/96S

## L-半乳糖苷-1, 4-内酯脱氢酶 (Gal LDH) 检测试剂盒说明书

### 微量法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 一、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。

#### 二、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。

#### 三、需自备的仪器和用品:

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。

#### 四、试剂的组成和配置:

| 种类  | 试剂规格        | 储存条件 | 使用方法及注意事项           |
|-----|-------------|------|---------------------|
| 试剂一 | 液体×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  |

## 五、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。

## 六、Gal LDH 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到550nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二在25℃水浴锅中预热30min。
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， $\Delta A = A2 - A1$ 。

## 七、Gal LDH 活性计算公式：

### a. 使用微量石英比色皿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1μmol Cyt c为1个酶活单位。

$$\text{Gal LDH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 289 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### (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1μmol Cyt c 为1个酶活单位。

$$\text{Gal LDH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}) = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 289 \times \Delta A \div W$$

$\epsilon$ ：还原型 Cyt c 摩尔消光系数， $17.3 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ； $d$ ：比色皿光径（cm），1cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.2mL=0.0002 L； $10^6$ ：1mol=1×10<sup>6</sup> μmol； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中上清液体积，20 μL=0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：提取液体积，1 mL； $\text{Cpr}$ ：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。

### b. 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1μmol Cyt c为1个酶活单位。

$$\text{Gal LDH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 578 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### (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1μmol Cyt c为1个酶活单位。

$$\text{Gal LDH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}) = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 578 \times \Delta A \div W$$

$\epsilon$  : 还原型 Cyt c 摩尔消光系数,  $17.3 \times 10^3$  L/mol/cm; d: 96孔板光径(cm), 0.5cm;  
V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL=0.0002 L;  $10^6$ : 1mol=1×10<sup>6</sup> μmol; V样: 加入反应体系中上清液体积, 20 μL=0.02mL; V样总: 提取液体积, 1 mL; Cpr: 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 BCA 蛋白质含量测定试剂盒(货号:ZC-S0470);  
T: 反应时间, 2min。

#### 八、注意事项:

试剂二和试剂三配制好后3天内使用完。