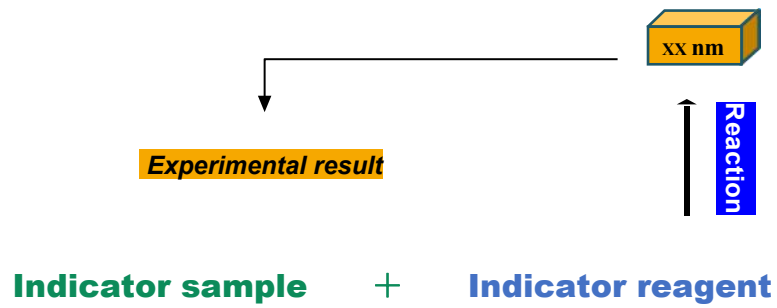


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

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

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：

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

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20 μL上清液、160 μL预热的试剂二和20 μL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：

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1 μmol 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°C中每克样品每分钟还原1 μmol Cyt c 为1个酶活单位。

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

$$= 289 \times \Delta A \div W$$

ε：还原型 Cyt c 摩尔消光系数， 17.3×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径(cm)，1cm；V 反总：反应体系总体积，0.2mL=0.0002 L； 10^6 ：1mol=1×10⁶ 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°C中每毫克蛋白每分钟还原1 μmol Cyt c为1个酶活单位。

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

$$= 578 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2). 按样本质量计算

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

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

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

ε：还原型 Cyt c 摩尔消光系数， 17.3×10^3 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=1×10⁶ 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。

注意事项：

试剂二和试剂三配制好后3天内使用完。