

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

分光光度法 50 管/48 样

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、1mL 玻璃比色皿、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 50mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃保存。临用前加入 40mL 蒸馏水，充分溶解。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃保存。临用前加入 5mL 蒸馏水，充分溶解。

粗酶液提取：

按照组织质量 (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 1mL 玻璃比色皿中加入 100μL 上清液、800μL 预热的试剂二和 100μL 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：

(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。

$$\text{Gal LDH (nmol/min/mg prot)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9}{(\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T} \\ = 289 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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 1nmol Cyt c 为 1 个酶活单位。

$$\text{Gal LDH (nmol/min/g 鲜重)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9}{(W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T} \\ = 289 \times \Delta A \div W$$

ϵ : 还原型 Cyt c 摩尔消光系数, $17.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径(cm), 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1\text{ mL} = 0.001 \text{ L}$; 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, $100\mu\text{L} = 0.1\text{ mL}$; 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; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; W , 样本质量, g; 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。