

## **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。

Lifemall.asia

To be with you

**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°C 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°C 中每毫克蛋白每分钟还原 1nmol Cyt c 为 1 个酶活单位。

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

(2). 按样本质量计算

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

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

$\epsilon$ : 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, 1mL=0.001 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, 100μL=0.1mL;  $\text{Cpr}$ : 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;  $V_{\text{样总}}$ : 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。

Lifemall.asia

To be with you