Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd
Tel: 400-968-6088
Fax: 010-56371281
Http://www.solarbio.com

L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶（Gal LDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC1255

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存

溶液的配制：

1．试剂一：临用前加入 16 mL 蒸馏水，充分溶解；

2．试剂二：临用前加入 2 mL 蒸馏水，充分溶解。

产品说明：

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。

Gal LDH催化L-半乳糖内酯还原氧化型细胞色素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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

台式离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液器、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

称取约 0.1g 样本，加提取液 1mL，冰上充分研磨，13000g 4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

二、测定步骤

1、 分光光度计/酶标仪预热30 min，调节波长到550nm，蒸馏水调零。

2、 按样本数取出一定量的试剂一在25℃水浴锅中预热30 min以上，其余的分装保存(-20℃)。

3、 空白管: 依次在微量比色皿/96孔板中加入20μL蒸馏水、160μL预热的试剂一和20μL试剂二，迅速混匀后于550nm比色，记录10s和130s的吸光值，分别为A1，A2，ΔA空白管=A2-A1。

4、 测定管: 依次在微量比色皿/96孔板中加入20μL上清液、160μL预热的试剂一和20μL试剂二，迅速混匀后于550nm比色，记录10s和130s的吸光值，分别为A3，A4，ΔA测定管=A4-A3。

三、Gal LDH 活性计算

a.使用微量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。

Gal LDH（U/mg prot）=[(ΔA测定管-ΔA空白管)÷(ε×d)×V反总×10^6]÷(Cpr×V样)÷T

=0.289×(ΔA测定管-ΔA空白管) ÷Cpr

（2）按样本质量计算

Gal LDH活性单位定义：25℃中每克样本每分钟还原1μmol Cyt c为1个酶活单位。

Gal LDH（U/g 质量）=[(ΔA测定管-ΔA空白管)÷(ε×d)×V反总×10^6]÷(V样÷V样总×W)÷T

=0.289×(ΔA测定管-ΔA空白管) ÷W

ε：还原型Cyt c摩尔消光系数，17.3×10^3L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，0.2mL=0.0002L；10^6：单位换算系数，1mol=1×10^6μmol；V样：加入反应体系中上清液体积，20μL=0.02mL；V样总：提取液体积，1mL；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL，蛋白质浓度需要另外测定；W：样本质量，g；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。

Gal LDH (U/mg prot) = [(ΔA测定管-ΔA空白管)÷(ε×d)×V反总×10^6]÷（Cpr×V样）÷T

=0.482×(ΔA测定管-ΔA空白管) ÷Cpr

（2）按样本质量计算

Gal LDH活性单位定义：25℃中每克样本每分钟还原1μmol Cyt c为1个酶活单位。

Gal LDH (U/g 质量) = [(ΔA测定管-ΔA空白管)÷(ε×d)×V反总×10^6]÷(V样÷V样总×W)÷T

=0.482×(ΔA测定管-ΔA空白管) ÷W

ε：还原型Cytc摩尔消光系数，17.3×10^3L/mol/cm；d：96孔板光径，0.6cm；V反总：反应体系总体积，0.2mL=0.0002L；10^6：单位换算系数，1mol=1×10^6μmol；V样：加入反应体系中上清液体积，20μL=0.02mL；V样总：提取液体积，1mL；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL，蛋白质浓度需要另外测定；W：样本质量，g；T：反应时间，2min。

注意事项：

1、在测定酶活时要注意温度。建议取小烧杯一只装入一定量的 25℃蒸馏水，将此烧杯放入 25℃水浴锅中，在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中；若使用 96 孔板，反应期间应放入 25℃培养箱中。

2、建议两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。

3、加入最后一种试剂后需迅速混匀并测定 OD 值。

实验实例：

1、 取 0.1g 土豆加入 1mL 提取液冰上充分研磨，13000g 4℃离心 10min，取上清液置冰上，按照测定步骤操作，用微量比色皿测得计算 ΔA 测定管=A4-A3=0.9253-0.7844=0.1409，ΔA 空白管=A2-A1=0，按样本质量计算酶活得：Gal LDH（U/g 质量）=0.289×(ΔA 测定管-ΔA 空白管) ÷W=0.4072 U/g 质量。

相关系列产品：

BC1230/BC1235 抗坏血酸（AsA）含量检测试剂盒

BC1240/BC1245 脱氢抗坏血酸（DHA）含量检测试剂盒

BC0650/BC0655 单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）活性检测试剂盒