L-半乳糖苷-1,4-内酯脱氢酶（Gal LDH）检测试剂盒（分光光度法）

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。

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 测定步骤：

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，△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 1μmol Cyt c 为 1 个酶活单位。

Gal LDH (μmol/min/mg prot) = △A÷ε÷d×V 反总×10 6÷（Cpr×V 样）÷T

=289×△A ÷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。

Gal LDH (μmol/min/g 鲜重) = △A÷ε÷d×V 反总×10 6÷（W×V 样÷V 样总）÷T

=289×△A ÷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(cm)，1cm；

V 反总：反 应体系总体积，1mL=0.001 L；

10 6：1mol=1×10 6μmol；

V 样：加入反应体系中上清液体积， 100μL=0.1mL；

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 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。