

L-半乳糖脱氢酶（GalDH）活性检测试剂盒说明书

（货号：G0218F 分光法 24 样）

一、产品简介：

L-半乳糖脱氢酶(EC 1.1.1.316, L-galactose dehydrogenase, GalDH)是植物合成抗坏血酸 Vc 的重要酶之一，L-半乳糖脱氢酶在 C1 位直接氧化 L-半乳糖生成 Vc 合成的直接底物—L-半乳糖-1,4-内酯，同时将 NAD⁺还原为 NADH。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：该酶促过程产生的 NADH 与特异显色剂反应产生在 450nm 处有最大吸收峰的可有物质，通过检测 450nm 处的增加速率，进而计算出 GalDH 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 3mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂 4℃保存。
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	四 a: 粉剂×2 瓶 四 b: 液体 14mL×1 瓶	室温保存	临用前甩几下使粉体落入底部，向一瓶四 a 中加入 7mL 四 b 充分溶解，用不完的室温保存。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、可调式移液枪、离心机、研钵。

四、L-半乳糖脱氢酶（GalDH）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4℃约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min，调节波长到 450 nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）或于 25℃下水浴 15min 左右。

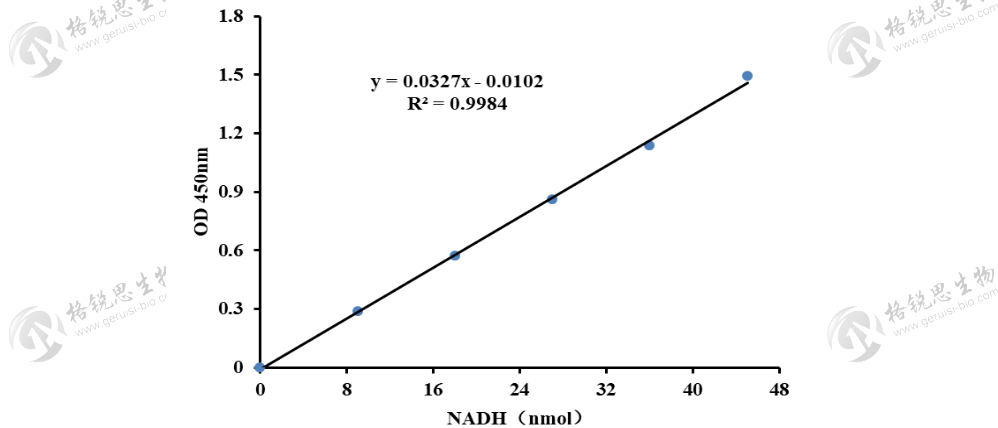
③ 在 1mL 比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照
样本	150	150
试剂一	40	40
试剂二	40	40
试剂三	120	520
试剂四	400	

混匀，立即于 450nm 处读取 A1 值，室温静置 20min 后读取 A2 值（观察：酶活性越大，则黄色越明显）， $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 对照} - A1 \text{ 对照})$ 。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0327x - 0.0102$ ，x 是 NADH 摩尔质量 (nmol)，y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

定义：每毫克组织蛋白每小时使 1 nmol NAD⁺转换成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GalDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0102) \div 0.0327] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 611.6 \times (\Delta A + 0.0102) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

定义：每克组织每小时使 1 nmol NAD⁺转换成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GalDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0102) \div 0.0327] \div (W \times V1 \div V) \div T = 611.6 \times (\Delta A + 0.0102) \div W$$

4、按细胞数量计算：

定义：每 10⁴ 个细胞每小时使 1 nmol NAD⁺转换成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GalDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0102) \div 0.0327] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 611.6 \times (\Delta A + 0.0102) \div 500$$

5、按液体体积计算：

定义：每毫升液体每小时使 1nmol NAD⁺转换成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GalDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0102) \div 0.0327] \div V1 \div T = 611.6 \times (\Delta A + 0.0102)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.15 mL；

T---反应时间，20 min=1/3h；

W---样本质量，g； 500---细胞数量，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（4 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ）：向标准品 EP 管里面加入 0.7mL 蒸馏水（母液需在两天内用且 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 150 μL 标准品+40 μL 试剂二+160 μL 试剂三+400 μL 水，混匀后室温 5min 后于 450nm 处读值，根据结果即可制作标准曲线。