

L-半乳糖脱氢酶（GalDH）活性检测试剂盒说明书

（货号：ADS-W-G010 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂 4℃保存。
试剂二	液体 1 支	4℃避光保存	
试剂三	液体 10ml×1 瓶	4℃保存	
试剂四	四 a：粉剂 1 瓶 四 b：液体 8ml×1 瓶	室温避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 向四 a 中加入 6mL 四 b 充分溶解，用不完的室温保存。
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

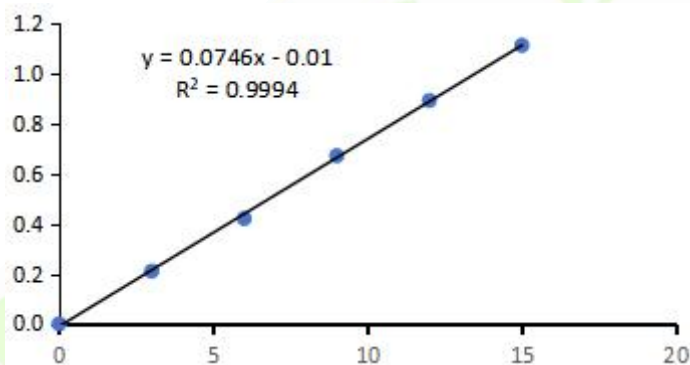
② 所有试剂解冻至室温 (25℃) 或于 25℃下水浴 15min 左右, 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照
样本	50	50
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	30	130
试剂四	100	
混匀, 立即于 450nm 处读取 A1 值, 25℃下孵育 20min 后读取 A2 值 (观察: 酶活性越大, 则黄色越明显), $\Delta A = (A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}) - (A2_{\text{对照}} - A1_{\text{对照}})$ 。		

【注】: 若 ΔA 过小, 可以延长反应时间 T (如: 40min 或更长) 再读取 A2; 或增加加样体积 V1 (如由 50μL 增至 80μL, 则试剂三相应减少为零); 或加大样本取样量 W (如增加到 0.2g), 重新调整的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0746x - 0.01$, 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。

$$\text{GalDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.01) \div 0.0746] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 804.3 \times (\Delta A + 0.01) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{GalDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.01) \div 0.0746] \div (W \times V1 \div V) \div T = 804.3 \times (\Delta A + 0.01) \div W$$

4、按细胞数量计算:

定义: 每 10^4 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。

$$\text{GalDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.01) \div 0.0746] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 804.3 \times (\Delta A + 0.01) \div 500$$

5、按液体体积计算:

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

$$\text{GalDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.01) \div 0.0746] \div V1 \div T = 804.3 \times (\Delta A + 0.01)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.05 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 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℃保存), 标准品母液浓度为 4μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24,

0.3 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 75 μ L，加入 925 μ L 蒸馏水，混匀得到 0.3 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.06	0.12	0.18	0.24	0.3
标品稀释液 μ L	0	40	80	120	160	200
水 μ L	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		50
试剂二	10	10
试剂三	40	40
蒸馏水	100	100
混匀后室温静置 5min，于 450nm 处读值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		