



莽草酸脱氢酶活性检测试剂盒

SD Assay Kit

微量法

产品编号: AK469M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES469	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK469-A	25mL×1 瓶	4℃保存;
AK469-B	粉剂×2 瓶	-20℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 莽草酸途径是存在于植物、真菌和微生物中的一条重要的代谢途径, 莽草酸脱氢酶 (Shikimate dehydrogenase, SD) 是莽草酸合成途径中的关键酶。

原理: 莽草酸脱氢酶催化莽草酸和 NADP 产生 NADPH, 检测 340nm 下的吸光值增加速率来表示 SD 活性。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): ES469 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES469), 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); 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g): ES469 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES469), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

- 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 准备 96 孔 UV 板一块 (非普通酶标板, 普通酶标板只能透过可见光, 不能透过紫外光, 检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板)。
- 样本测定
 - 在 AK469-B 中加入 10mL AK469-A 充分溶解混匀, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min, 现配现用。
 - 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
样本	10
AK469-B	190
混匀, 立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 5min20s 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

SD 活性计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

- 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。