

山梨醇脱氢酶(SDH)活性检测试剂盒说明书

Sorbitol dehydrogenase Assay Kit

微量法

货号：AK145

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
提取液 ES23	100ml×1 瓶	4°C保存；
AK145-A	10ml×1 瓶	4°C保存；
AK145-B	粉剂×1 瓶	4°C保存；
在 AK145-B 中加入 7.6mL AK145-A 和 11.4mL 蒸馏水充分溶解，置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5min；用不完的试剂 4°C 保存一周		

※ 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：山梨醇脱氢酶 (Sorbitol dehydrogenase, SDH) (EC 1.1.1.14) 催化山梨醇脱氢生成果糖，是调控生物体内山梨醇含量的关健酶之一。

原理：SDH 催化山梨醇脱氢生成果糖，同时还原 NAD+生成 NADH，测定 340nm 吸光度增加速率可以计算 SDH 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 (UV 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 (10⁴ 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES23)，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°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 组织：按照组织质量 (g)：提取液 ES23 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液 ES23)，进行冰浴匀浆，8000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 血清 (浆) 样品：直接检测。

检测步骤：

- 分光光度计或酶标仪预热 30min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
- 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(ul)
样本	10
AK145-B	190
混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 2min20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

- 血清 (浆) SDH 活力的计算

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$SDH (U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中 SDH 活力的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$SDH (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 1608 \times \Delta A \div W$$

(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生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$SDH (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.216 \times \Delta A$$

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，2 min； C_{pr} ：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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 血清（浆）SDH 活力的计算

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$SDH (U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 3216 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中 SDH 活力的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$SDH (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 3216 \times \Delta A \div W$$

(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生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$SDH (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.426 \times \Delta A$$

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，2 min； C_{pr} ：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。