

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℃保存; |
| AK145-A | 10ml×1 瓶 | 4℃保存; |
| AK145-B | 粉剂×1 瓶 | 4℃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℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min; 用不完的试剂 4℃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键酶之一。

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:

1. 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℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 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℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

检测步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
2. 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

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。

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

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。

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

（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。

$$\begin{aligned} \text{SDH (U/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

（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。

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

注： V 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，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 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。

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。

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

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。

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

（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。

$$\begin{aligned} \text{SDH (U/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3216 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

（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。

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

注： V 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，2 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。