

山梨醇脱氢酶(SDH)活性检测试剂盒说明书

Sorbitol dehydrogenase Assay Kit

分光光度法

货号: AK144

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES23	液体 60ml×1 瓶	4℃保存
AK144-A	液体 20ml×1 瓶	4℃保存
AK144-B	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前每瓶加入 15mL 蒸馏水, 用不完的试剂仍 4℃保存。
AK144-C	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前每瓶加入 15mL 蒸馏水, 用不完的试剂仍-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: 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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、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. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
2. 在 1ml 玻璃比色皿中按顺序加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (ul)
AK144-A	400
AK144-B	300
AK144-C	300
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确水浴 5min	
样本	50
加样本的同时开始计时, 记录 20s 时的初始吸光度 A1 和 2min 20s 时的吸光度 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

计算公式:

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。

$$\text{SDH (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1688 \times \Delta A$$

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。

$$\text{SDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1688 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{SDH (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1688 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\text{SDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.376 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1.05×10^{-3} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 mL; $V_{\text{样总}}$: 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。