

NADP⁺-山梨醇脱氢酶活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10318W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

山梨醇脱氢酶 (sorbitol dehydrogenase, SDH) 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, 依据依赖的辅酶分为 NADP⁺依赖性山梨醇脱氢酶 (NADP⁺-SDH, EC 1.1.1.B60) 和 NAD⁺依赖性山梨醇脱氢酶 (NAD⁺-SDH), NADP⁺-SDH 催化山梨醇转化成葡萄糖, NAD⁺-SDH 催化山梨醇转成果糖。

NADP⁺-SDH 催化山梨醇脱氢生成葡萄糖, 同时还原 NADP⁺生成 NADPH, 测定 340nm 吸光度增加速率可以计算 NADP⁺-SDH 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 100mL×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 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉剂 1 支	4℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃ 离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注意】若样本颜色较深 (如植物叶片), 可引起起始值 A1 值较大如超过 1.6, 可在样本提取过程中增加除色素步骤: 取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 80%乙醇冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃ 离心 10min, 弃掉色素较深的上清液; 以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液, 混匀或再次冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清置冰上待测。

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: 澄清的液体样本直接检测; 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, 设置温度 25℃, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂放在 25℃水浴 5min;

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	160
混匀, 25℃下孵育 10min	
试剂三	10
混匀, 25℃下, 20s 时于 340nm 处读取 A1, 20min 后读取 A2。ΔA=A2-A1。	

【注】: 若ΔA 过小, 可以延长反应时间 (如: 60min 或更长) 再读取 A2, 或加大样本体积 V1 (如增至 40μL, 则试剂二相应减少), 重新调整的反应时间 T 和加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1. 按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP}^+\text{-SDH}(\text{nmol/min/mg prot})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 160.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP}^+\text{-SDH}(\text{nmol/min/g 鲜重})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 160.8 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP}^+\text{-SDH}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.32 \times \Delta A$$

4. 按照液体体积计算

酶活定义: 每毫升液体每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP}^+\text{-SDH}(\text{nmol/min/mL})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 160.8 \times \Delta A$$

ε---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02 mL;

V2---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

T---反应时间, 20 min;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

W---样本质量;

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。