

山梨醇脱氢酶(SDH)检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX074 微板法 96 样)

有效期: 3 个月

测定意义:

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。

测定原理:

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。

需自备的仪器和用品:

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。

试剂组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 10mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存;

粗酶液提取:

1、细菌和细胞: 收集细菌或细胞到离心管内, 弃上清, 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液充分匀浆以破碎并裂解细胞 (功率 20%, 超声 3S 秒, 间隔 10S, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液冰浴匀浆; 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

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。

测定步骤:

1、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。

2、样本测定

(1) 在试剂二中加入 7.6mL 试剂一和 11.4mL 双蒸水充分溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min;

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本和 190 μL 试剂二, 混匀, 立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A_1 和 2min20s 后的吸光值 A_2 , 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

SDH 活性计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、液体 SDH 活力的计算

单位的定义: 每毫升液体每分钟生成 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。

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

(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。

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

(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。

$$\text{SDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 3.215 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ mol/L/cm}$ ；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：样品质量，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、液体 SDH 活力的计算

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

$$\text{SDH (U/ml)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 3215 \times \Delta A$$

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。

$$\text{SDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div Cpr$$

(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。

$$\text{SDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 3215 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{SDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ mol/L/cm}$ ；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：样品质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。