

6-磷酸山梨醇脱氢酶(Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase) 活性试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TDX057 紫外法 48 样)

一、产品简介:

6-磷酸山梨醇脱氢酶 (S6PDH, EC 1.1.1.200) 又称醛糖 6-磷酸还原酶 (Aldose-6-phosphate reductase, A6PR), 催化 D-山梨糖醇 6-磷酸和 D-葡萄糖 6-磷酸之间的相互转化。研究发现该酶在苹果叶片等蔷薇科植物中广泛分布, 其在山梨醇合成中起着重要作用。

6-磷酸山梨醇脱氢酶 (S6PDH) 催化 D-葡萄糖 6-磷酸还原, 并使还原型辅酶II (NADPH) 氧化。因此, 通过检测 340nm 下 NADPH 的下降速率, 即可得出 S6PDH 的酶活性大小。

该酶催化的反应: $D\text{-sorbitol } 6\text{-phosphate} + \text{NADP}^+ = D\text{-glucose } 6\text{-phosphate} + \text{NADPH} + \text{H}^+$

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 2 支	4°C保存	使用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支分别加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂 1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

四、6-磷酸山梨醇脱氢酶 (S6PDH) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 液体样本: 澄清的液体样本, 可直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

③ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	20
试剂二	680
混匀, 室温 (25°C) 下孵育 10min	
试剂三	20

混匀，室温 (25°C) 下，于 340nm 处读取 A1，
10min 后读取 A2。ΔA=A1-A2。

- 【注】
1. 若 10s 后反应体系未稳定可延长到 1min 再读值。
 2. 若 ΔA 在零附近，可适当延长反应时间 T 至 20min 或更长读取 A2，或适当加大样本量 V1（如增至 60μL，则试剂二相应减少），则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。
 4. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量 V1，则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。
或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4°C 离心 10min，上清液用于检测；
 5. 若 ΔA 大于 0.3，需减少反应时间 T（如减至 5min），则改变后的 T 需代入公式重新计算。
 6. 若下降趋势不稳定，可以每隔 30S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也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：

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

S6PDH 活力(nmol/min/mg prot)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10⁹]÷(V1×Cpr)÷T=305.5×ΔA÷Cpr

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

S6PDH 活力(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10⁹]÷(W×V1÷V)÷T=305.5×ΔA÷W

3、按液体体积计算：

单位定义：每毫升液体在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

S6PDH 活力(nmol/min/mL)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10⁹]÷V1÷T=305.5×ΔA÷W

V---加入提取液体积，1 mL；

V2---反应体系总体积，7.6×10⁻⁴ L；

ε---NADPH 摩尔消光系数，6.22×10³ L /mol/cm；

T---反应时间，10min；

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL)，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。

V1---加入样本体积，0.04mL；

d---光径，1cm；

W---样本质量，g；