

# 山梨醇脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10459

规格: 50T/48S

**产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。**

| 试剂名称 | 规格           | 保存条件    |
|------|--------------|---------|
| 提取液  | 液体 60 mL×1 瓶 | 4°C保存   |
| 试剂一  | 粉剂×1 瓶       | 4°C保存   |
| 试剂二  | 粉剂×1 瓶       | -20°C保存 |
| 试剂三  | 粉剂×1 瓶       | -20°C保存 |
| 试剂四  | 粉剂×5 瓶       | -20°C保存 |
| 试剂五  | 液体 80 mL×1 瓶 | 4°C保存   |
| 标准品  | 粉剂×1 支       | -20°C保存 |

溶液的配制:

- 1、试剂一: 取 50 mL 试剂五加入试剂一粉剂中, 溶解后 4°C保存;
- 2、试剂二: 临用前加入 12.5 mL 试剂五, 充分溶解后, 可以每瓶 2.5 mL 分装, -20°C保存;
- 3、试剂三: 临用前加入 12.5 mL 试剂五, 充分溶解后, 可以每瓶 2.5 mL 分装, -20°C保存;
- 4、试剂四: 临用前每瓶加入 10 mL 试剂一, 现用现配, 24 h 变质;
- 5、标准品: 临用前加入 1.4 mL 蒸馏水, 即 10  $\mu$ mol/mL NADH 标准品。-20°C保存一周。

## 产品说明:

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。SDH 催化山梨醇脱氢生成果糖, 同时还原  $\text{NAD}^+$  生成 NADH, 生成的 NADH 能将电子传递给 NBT 生成紫色的甲臞, 根据这一原理可以计算 SDH 活性。

**注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

## 需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

## 操作步骤:

### 一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

- 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 ( $10^4$  个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例加入提取液 (建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 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); 8000  $\times$ g 4°C离心 10 min, 取上清, 置冰上待测。

2、组织 按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1 g 组织, 加入 1 mL 提取液), 进行冰浴匀浆。8000 ×g 4°C离心 10 min, 取上清, 置冰上待测。

3、血清 (浆) 样本: 直接检测。

## 二、测定步骤

1、可见分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长至 570 nm, 蒸馏水调零。

2、标准管的测定: 将 10 μmol/mL NADH 标准品用水稀释至 1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3 μmol/mL 的标准溶液, 然后按下表操作:

| 试剂名称(μL) | 标准管 | 空白管 |
|----------|-----|-----|
| 标准溶液     | 100 | -   |
| 蒸馏水      | -   | 100 |
| 试剂二      | 150 | 150 |
| 试剂三      | 150 | 150 |
| 试剂四      | 600 | 600 |

混匀后室温避光放置 20 min, 之后分别测定标准管和空白管在 570 nm 下的吸光度, 记为 A 标准管、A 空白管, 计算  $\Delta A$  标准=A 标准管-A 空白管。

3、样本的测定:

| 试剂名称(μL) | 测定管 |
|----------|-----|
| 样本       | 100 |
| 试剂二      | 150 |
| 试剂三      | 150 |
| 试剂四      | 600 |

将上述试剂按顺序加 1 mL 玻璃比色皿中, 加样本的同时开始计时, 记录 10 秒时的初始吸光度 A1, 比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴中准确反应 3 分钟; 迅速取出比色皿并擦干, 570 nm 下比色, 记录 3 分 10 秒时的吸光度 A2, 计算  $\Delta A$  测定=A2-A1。(整个实验过程要避光)

## 三、SDH 活性计算

1、标准曲线的绘制:

以  $\Delta A$  标准为 y 轴, 以标准溶液浓度为 x 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程  $y=kx+b$ , 将  $\Delta A$  测定带入方程得到 x (μmol/mL)。

2、SDH 活性计算:

(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。

$$\text{SDH (U/mL)} = 1000 \times x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 333 \times x$$

(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。

$$\text{SDH (U/mg prot)} = 1000 \times x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 333 \times x \div \text{Cpr}$$

2) 按样本质量计算

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。

$$\text{SDH (U/g 质量)} = 1000 \times x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 333 \times x \div W$$

3) 按细菌或细胞数量计算

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。

$$\text{SDH (U/10}^4 \text{ cell)} = 1000 \times x \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.666 \times x$$

V 样：加入样本体积，0.1 mL；V 样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间，3 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；1000：单位换算系数，1  $\mu\text{mol}$ =1000 nmol。

**注意事项：**

1.  $\Delta A$  大于 0.7 时，建议将样本用提取液稀释后测量。

2. 测定过程中样本和工作液在冰上放置，以免变性和失活。

3. 比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 或 25°C 水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。

**参考文献：**

Aguayo M F, Ampuero D, Mandujano P, et al. Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant science*, 2013, 205: 63-75.