

## 山梨醇脱氢酶活性检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA1264

产品规格：50管/48样

### 产品简介：

SDH（EC1.1.1.14）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NAD<sup>+</sup>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。

### 产品组成：

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

### 溶液的配制：

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

### 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<sup>4</sup>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）；8000×g 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），进行冰浴匀浆。8000×g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清（浆）样本：直接检测。

#### 二、测定步骤



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

1. 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至570nm，蒸馏水调零。
2. 标准管的测定：将10 $\mu$ mol/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 $\mu$ mol/mL的标准溶液，然后按下表操作：

试剂名称( $\mu$ L)	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20min，之后分别测定标准管和空白管在570nm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( $\mu$ L)	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 1mL 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 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ 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，570nm 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 ( $\mu$ mol/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 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

- (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 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

- 2) 按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

- 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 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

V 样：加入样本体积，0.1mL；V 样总：提取液体积，1mL；T：反应时间，3min；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 $\mu$ mol=1000nmol。

### 注意事项：



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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.



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>