

# 山梨醇脱氢酶检测试剂盒

(货号: BC051 分光光度法 50T/48 样)

## 一、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。

## 二、测定原理:

SDH催化山梨醇脱氢生成果糖, 同时还原NAD<sup>+</sup>生成NADH, 测定340nm吸光度增加速率可以计算SDH活性。

## 三、仪器设备 (自备):

可调式移液器、水浴锅、台式离心机、紫外分光光度计、1mL石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

## 四、试剂组成: (试剂盒有效期 3 个月)

**提取液:** 液体60mL×1 瓶, 4°C保存;

**试剂一:** 液体20mL×1 瓶, 4°C保存;

**试剂二:** 粉剂×1 瓶, 4°C保存; 临用前每瓶加入15mL蒸馏水, 用不完的试剂仍4°C保存。

**试剂三:** 粉剂×1 瓶, -20°C保存; 临用前每瓶加入15mL蒸馏水, 用不完的试剂仍-20°C保存。

## 五、操作步骤:

### 1、粗酶液提取:

- (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) 500 ~ 1000: 1的比例 (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10 秒, 重复30 次); 8000g, 4°C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)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。8000g, 4°C离心10min, 取上清置冰上待测。
- (3)、血清 (浆) 样品: 直接检测。

### 2、操作表:

试 剂	测 定
试剂一 (μL)	400
试剂二 (μL)	300
试剂三 (μL)	300
混匀, 37°C (哺乳动物) 或25°C (其它物种) 准确水浴5min	
样本 (μL)	50
将上述试剂按顺序加入1mL石英比色皿中, 加样本同时计时, 记录20秒时的初始吸光度A1和2分钟20秒时的吸光度A2, 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。	

## 六、计算公式：

### 1、血清（浆）中SDH活力的计算：

单位定义：每毫升血清（浆）每分钟生成1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{SDH活力 (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d} \div V_{\text{样}} \div T = 1688 \times \Delta A$$

### 2、组织、细菌或细胞中SDH活力的计算：

#### (1)、按蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克蛋白每分钟生成1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SDH活力 (U/mgprot)} &= \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 1688 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

#### (2)、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟生成1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SDH活力 (U/g组织)} &= \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d} \div \left( V_{\text{样}} \times \frac{W}{V_{\text{样总}}} \right) \div T \\ &= 1688 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

#### (3)、按细菌或细胞密度计算：

单位定义：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。

$$\begin{aligned} \text{SDH活力 (U/10}^4 \text{ cells)} &= \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d} \div \left( V_{\text{样}} \times \frac{\text{细胞数}}{V_{\text{样总}}} \right) \div T \\ &= 1688 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

**V<sub>反总</sub>**：反应体系总体积，1.05×10<sup>-3</sup> L；

**ε**：NADH 摩尔消光系数，6.22×10<sup>3</sup> L / mol /cm；

**d**：比色皿光径，1cm；

**V<sub>样</sub>**：加入样本体积，0.05 mL；

**V<sub>样总</sub>**：加入提取液体积，mL；

**T**：反应时间，2 min；

**Cpr**：样本蛋白质浓度，mg/mL；

**W**：样本质量，g；

**细胞数**：细菌或细胞总数，10<sup>4</sup>个。