

NADP⁺-山梨醇脱氢酶活性测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介：

山梨醇脱氢酶 (sorbitol dehydrogenase, SDH) 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，依据依赖的辅酶分为 NADP⁺依赖性山梨醇脱氢酶 (NADP⁺-SDH, EC 1.1.1.B60) 和 NAD⁺依赖性山梨醇脱氢酶 (NAD⁺-SDH)，NADP⁺-SDH 催化山梨醇转化成葡萄糖，NAD⁺-SDH 催化山梨醇转化成果糖。

NADP⁺-SDH 催化山梨醇脱氢生成葡萄糖，同时还原 NADP⁺生成 NADPH，测定 340nm 吸光度增加速率可以计算 NADP⁺-SDH 酶活性大小。

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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃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。
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 mg×1 支	4℃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：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、NADP⁺-山梨醇脱氢酶 (NADP⁺-SDH) 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（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

【注意】 若样本颜色较深（如植物叶片），可引起起始值 A1 值较大如超过 1.6，可在样本制备过程中增加除色素步骤：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 80%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 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）；4℃约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量 (10⁴)：提取液 (mL) 为 500~1000：1 的比例进行提取。

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。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，设置温度 25℃,调节波长至 340nm。

② 所有试剂放在 25℃水浴 5min；

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20

试剂一	10
试剂二	160
混匀，25℃下孵育 10min	
试剂三	10
混匀，25℃下，20s 时于 340nm 处读取 A1， 20min 后读取 A2。ΔA=A2-A1。	

【注】：若ΔA 过小，可以延长反应时间（如：60min 或更长）再读取 A2，或加大样本体积 V1（如增至 40μL，则试剂二相应减少），重新调整的反应时间 T 和加样体积 V1 需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：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP}^+\text{-SDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 160.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP}^+\text{-SDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 160.8 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP}^+\text{-SDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.32 \times \Delta A$$

4. 按照液体体积计算

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

$$\text{NADP}^+\text{-SDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 160.8 \times \Delta A$$

ε---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ；

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02 mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，20 min；

500---细菌或细胞总数，500 万；

W---样本质量；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。