

山梨醇脱氢酶活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1265

产品规格：100管/96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⁺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110mL×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30mL×1瓶	4℃
标准品	粉剂×1支	-20℃

溶液的配制：

1. 试剂一：取17mL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4mL试剂五，充分溶解后，可以每瓶0.8mL分装，-20℃保存；
3. 试剂三：临用前加入4mL试剂五，充分溶解后，可以每瓶0.8mL分装，-20℃保存；
4. 试剂四：临用前每瓶加入3.4mL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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、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（10⁴个）：提取液体积（mL）为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

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至570nm，蒸馏水调零。
2. 标准管的测定：将10μmol/mL NADH标准品用水稀释至1.5、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3μmol/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	20	-
蒸馏水	-	20



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

试剂二	30	30
试剂三	30	30
试剂四	120	120
混匀后室温避光放置20min, 取200 μ L于微量玻璃比色皿/96孔板中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 ΔA 标准=A标准管-A空白管。		

3. 样本的测定:

试剂名称(μ L)	测定管
样本	20
试剂二	30
试剂三	30
试剂四	120

将上述试剂按顺序加微量玻璃比色皿/96孔板中, 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 ΔA 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 ΔA 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 ΔA 测定带入方程得到 x (μ 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 1nmolNADH 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 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

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

2) 按样本质量计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟消耗 1nmolNADH 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 1nmolNADH 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, 0.02 mL; 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 μ mol=1000nmol。

注意事项:

1. ΔA 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 $^{\circ}$ C 或 25 $^{\circ}$ C, 取小烧杯一只装入一定量的 37 $^{\circ}$ C 或 25 $^{\circ}$ C 蒸馏水, 将此烧杯放入 37 $^{\circ}$ C 或 25 $^{\circ}$ 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com