

山梨醇脱氢酶 (sorbitol dehydrogenase, SH) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

SH (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。

测定原理:

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

需自备的仪器和用品:

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

试剂组成和配制:

提取液: 液体 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 20mL×1 瓶, 4℃ 保存;

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

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

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) 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); 8000g 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。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3、血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定

试剂名称(μL)	测定管
试剂一	400
试剂二	300
试剂三	300
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确水浴 5min	
样本	50

将上述试剂按顺序加入 1 mL 玻璃比色皿中, 加样本的同时开始计时, 记录 20 秒时的初始吸光度 A_1 和 2 分 20 秒时的吸光度 A_2 , 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

SH 活性计算:

1、血清（浆）SH 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。

$$\text{SH (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1688 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 SH 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。

$$\text{SH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1688 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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。

$$\text{SH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1688 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

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。

$$\text{SH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.376 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 1.05×10^{-3} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 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。