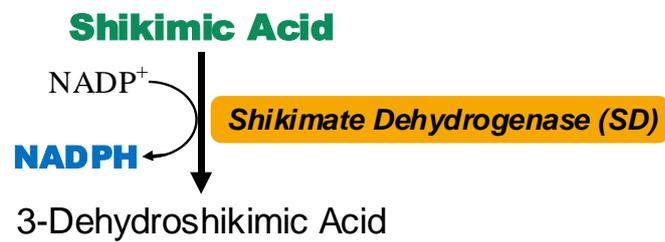




莽草酸脱氢酶 (SD) 活性检测试剂盒
Shikimate Dehydrogenase (SD) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



莽草酸脱氢酶 (SD) 活性检测试剂盒

Shikimate Dehydrogenase (SD) Activity Assay Kit

一、产品描述

莽草酸途径是存在于植物和微生物中，芳香族氨基酸、黄酮等芳香化合物的重要的代谢途径，其中莽草酸脱氢酶 (SD) 是莽草酸合成代谢途径中催化第四步反应的关键酶，在植物体中能够与脱氢奎尼酸形成具有双功能的酶以增加代谢物流通的效率，其活性分析对莽草酸途径的分析具有重要意义。

莽草酸脱氢酶能够催化莽草酸和 NADP^+ 产生 NADPH，NADPH 在 340 nm 处具有特征吸收峰，通过测定吸光值的增加速率即可表征莽草酸脱氢酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4°C 保存	含有不溶物，混匀后使用即可
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C 避光保存	使用前加入 5 mL 蒸馏水充分溶解
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C 避光保存	使用前加入 10 mL 蒸馏水充分溶解

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿（光径 10 mm）/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞到离心管内，按照细胞数量 (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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

②**检测工作液的制备（现用现配）**：使用前根据使用量按试剂一：试剂二：试剂三 = 7:4:8 (v/v) 的体积比例充分混匀，25°C 预热 15 min 后使用。

③在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
粗酶液	10	-
蒸馏水	-	10
检测工作液	190	190

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 20 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②准确反应 300 s 后，测定 320 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.莽草酸脱氢酶（SD）活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SD (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{1286.17 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SD (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{1286.17 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SD (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{1286.17 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SD (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times T} = 1286.17 \times \Delta A$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (U/mg \text{ prot}) = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}} \times T} = \frac{643.09 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (U/g) = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{643.09 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (U/10^4 \text{ cell}) = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{643.09 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (U/mL) = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times T} = 643.09 \times \Delta A$$

注释： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1.0 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间：300 s = 5 min； 10^9 ：单位换算系数，1 mol = 10^9 nmol。

四、注意事项

- ①粗酶液应置于冰上待测，且提取完成后建议 2 h 内完成测定以免失活；
- ②提取液中含有约 1 mg/mL 蛋白，样品测定蛋白浓度时减去提取液自身的蛋白浓度；
- ③若 ΔA 大于 1.0，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定，若 ΔA 小于 0.01，建议适当延长反应时间（10 min 或 15 min）后再进行测定，计算时相应修改；
- ④空白组为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况变化不超过 0.01；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

