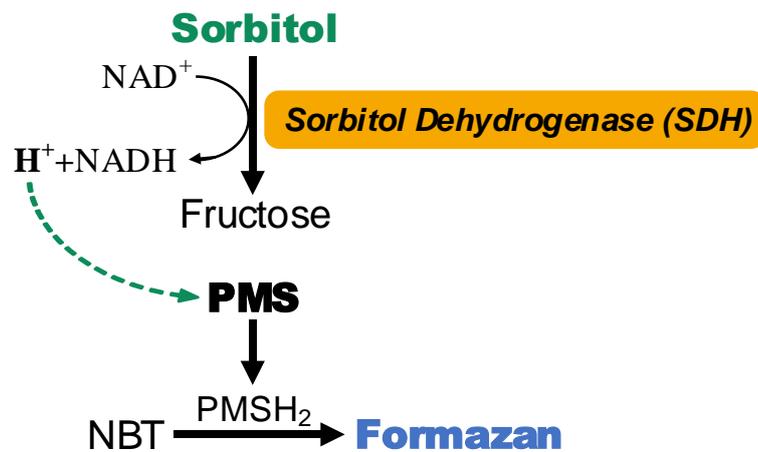




山梨醇脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒
Sorbitol Dehydrogenase (SDH) Activity Assay Kit



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



山梨醇脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒

Sorbitol Dehydrogenase (SDH) Activity Assay Kit

一、产品描述

山梨醇作为生物体内的光合产物、运输和储能物质对生物体代谢和生长起着重要作用，山梨醇脱氢酶 (SDH) 能够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，也可作为肝脏损伤的判断指标，并且具有不完全氧化多种羟基化合物的特性。

山梨醇脱氢酶能够催化山梨醇脱氢生成果糖，同时使 NAD^+ 还原生成 NADH 和 H^+ ，通过 PMS 的递氢作用，还原 NBT 生成紫色甲瓩，产物在 570 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征山梨醇脱氢酶的活性。

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 120 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 4 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂二	液体 4 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂三	粉剂×5 瓶	4°C 避光保存	使用前每瓶加入 3 mL 试剂五充分溶解 再加入 1 支试剂四充分溶解 (现用现配, 配制后有效期 24 h)
试剂四	粉剂×5 支	-20°C 避光保存	-
试剂五	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
标准品	粉剂×1 支	-20°C 避光保存	使用前加入 1.4 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ NADH 标准液)
标准稀释液的制备: 将 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ NADH 标准液使用蒸馏水稀释至 2.0、1.5、1.0、0.8、0.4、0.2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 即为标准稀释液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿 (光径 10 mm) /96 孔板、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至离心管内，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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），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：直接测定或适当稀释后再进行测定。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 570 nm，蒸馏水调零。

②在 96 孔板或离心管中依次加入下列试剂（避光条件下进行）：

试剂	标准组 (μL)	空白组 (μL)
标准稀释液	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	30	30
试剂二	30	30
试剂三	120	120
充分混匀，室温避光静置 20 min		

标准曲线的建立：测定 570 nm 处吸光值，记为 A 标准和 A 空白，计算 ΔA 标准=A 标准-A 空白；以 2.0、1.5、1.0、0.8、0.4、0.2 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标 (x)，对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ 。注：标准曲线只需测定 1-2 次。

③在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂（避光条件下进行）：

试剂	测定组 (μL)
粗酶液	20
试剂一	30
试剂二	30
试剂三	120

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s 时（总时间）570 nm 处吸光值，记为 A1 测定；②37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）准确反应 180 s，测定 190 s 时（总时间）570 nm 处吸光值，记为 A2 测定；③计算 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定，将 ΔA 测定带入标准方程 $y=kx+b$ 中计算 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

3.山梨醇脱氢酶 (SDH) 活性计算

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SDH (U/g)} = \frac{1000 \times x \times V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}}}{V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{333 \times x}{W}$$

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SDH (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{1000 \times x \times V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}}}{V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{333 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{SDH (U/mL)} = \frac{1000 \times x \times V_{\text{样}}}{V_{\text{样}} \times T} = 333 \times x$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，3 min；1000:单位换算系数：1 μmol =1000 nmol。

四、注意事项

- ①测定过程中所有试剂和粗酶液均应置于冰上放置，以免变性和失活；
- ②准确在 10 s 和 190 s 处完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔板检测，需使用多道移液器且分批进行检测，以确保组间反应时间一致；
- ③若 ΔA 测定大于 0.5 时，建议将粗酶液稀释适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ④若 A_{2} 测定超出标准曲线线性范围：高于最高值建议将粗酶液适当稀释后再进行测定，低于最低值建议适当增加样本量或延长反应时间后再进行测定，计算时相应修改；
- 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.

