

6-磷酸山梨醇脱氢酶(Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase) 活性试剂盒说明书 (微板法 96 样)

一、产品简介:

6-磷酸山梨醇脱氢酶 (S6PDH, EC 1.1.1.200) 又称醛糖 6-磷酸还原酶 (Aldose-6-phosphate reductase, A6PR), 催化 D-山梨糖醇 6-磷酸和 D-葡萄糖 6-磷酸之间的相互转化。研究发现该酶在苹果叶片等蔷薇科植物中广泛分布, 其在山梨醇合成中起着重要作用。

6-磷酸山梨醇脱氢酶 (S6PDH) 催化 D-葡萄糖 6-磷酸还原, 并使还原型辅酶II (NADPH) 氧化。因此, 通过检测 340nm 下 NADPH 的下降速率, 即可得出 S6PDH 的酶活性大小。

该酶催化的反应: $D\text{-sorbitol 6-phosphate} + \text{NADP}^+ = D\text{-glucose 6-phosphate} + \text{NADPH} + \text{H}^+$

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×2 支	4℃ 保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支分别加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
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。

四、6-磷酸山梨醇脱氢酶 (S6PDH) 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:

称取约 0.1g 组织样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	170
混匀, 室温 (25℃) 下孵育 10min	
试剂三	10
混匀, 室温 (25℃) 下, 于 340nm 处读取 A1, 10min 后读取 A2。ΔA=A1-A2。	

【注】 1.若 10s 后反应体系未稳定可延长到 1min 再读值。

2.若 ΔA 在零附近, 可适当延长反应时间 T 至 20min 或更长读取 A2, 或适当加大样本量 V1

(如增至 20 μ L, 则试剂二相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

4. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量 V1, 则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。
或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 上清液用于检测;
5. 若 ΔA 大于 0.25, 需减少反应时间 T (如减至 5min), 则改变后的 T 需代入公式重新计算。
6. 若下降趋势不稳定, 可以每隔 30S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也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

单位定义: 每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S6PDH 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算

单位定义: 每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S6PDH 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 643.1 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.01mL;

V2---反应体系总体积, 2×10^{-4} L;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol /cm;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 10min;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。