

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

微量法 100管/96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<sup>+</sup>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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体10mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，4℃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<sup>4</sup>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. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定

(1) 在试剂二中加入7.6mL试剂一和11.4mL蒸馏水充分溶解，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴5min；用不完的试剂4℃保存一周；

(2) 在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本和190μL试剂二，混匀，立即记录340nm处20s时的吸光值A1和 2min20s后的吸光值A2，计算ΔA=A2-A1。

SH活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

$$SH \text{ (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

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1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$SH \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$SH \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$SH \text{ (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.216 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm; d: 比色皿光径, 1cm; V样: 加入样本体积, 0.01 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。

#### b.用96孔板测定的计算公式如下

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。

$$SH \text{ (nmol/min /mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 3216 \times \Delta A$$

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。

$$SH \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$SH \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$SH \text{ (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.426 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm; d: 96孔板光径, 0.5cm; V样: 加入样本体积, 0.01 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。