

## 山梨醇-6-磷酸脱氢酶/6-磷酸山梨醇脱氢酶 (S6PDH) 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:

山梨醇-6-磷酸脱氢酶 (S6PDH) 主要存在于叶绿体和液泡中, 催化山梨醇-6-磷酸到葡萄糖-6-磷酸之间的可逆反应, 对山梨醇合成起到重要作用。

### 测定原理:

S6PDH 催化山梨醇-6-磷酸生成葡萄糖-6-磷酸的可逆反应, 在 340 nm 下测定 NADPH 减少速率表示酶活性。

### 需自备的仪器和用品:

酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、96 孔酶标板、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂的组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 液体 20mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 粉剂×1 支, -20°C 保存;

### 样本的前处理:

#### 1、细菌、细胞或组织样品的制备:

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 1000~5000: 1 的比例 (建议 2000 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

#### 2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

### S6PDH 测定操作表:

- 1、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。
- 2、将试剂二转移至试剂一中充分溶解; 在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 10min 以上; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融。
- 3、在 96 孔板中加入 10 $\mu$ L 样本和 190 $\mu$ L 试剂一, 混匀后立即记录 340nm 处 1min 后吸光值 A1 和 6min 后的吸光值 A2, 计算  $\Delta A = A1 - A2$ 。

**注意事项:** 若初始吸光值大于 2, 需将酶液用水稀释, 计算公式中乘以相应稀释倍数。

### S6PDH 活力单位的计算:

#### 1、血清 (浆) S6PDH 活力的计算:

单位的定义: 每 mL 血清 (浆) 每分钟生成 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S6PDH (nmol/min / mL)} &= [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T \\ &= 1286 \times \Delta A \end{aligned}$$

#### 2、组织、细菌或细胞中 S6PDH 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 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{S6PDH (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算：

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

$$\text{S6PDH (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 1286 \times \Delta A \div W$$

(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 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{S6PDH (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 0.643 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADPH 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，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；2000：细菌或细胞总数，2000 万。