

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

分光光度法 50 管/48 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:

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 液体 50mL×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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 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 1mL 石英比色皿中加入 50 μ L 样本和 950 μ 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 3, 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。

$$\begin{aligned} \text{S6PDH (nmol/min/mL)} &= [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T \\ &= 643 \times \Delta A \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{S6PDH (nmol/min /mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 643 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{S6PDH (nmol/min /g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 643 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{S6PDH (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.321 \times \Delta A \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol /cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.05 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。