

山梨醇脱氢酶（SDH）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2530

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×5 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 12mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 12mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×5 支	-20℃保存
试剂五	液体 55 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	-20℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：取 10 mL 试剂五加入 1 瓶试剂一粉剂中溶解，再加入一支试剂四，现用现配，24 h 变质；
- 2、标准品：临用前加入 1.4 mL 蒸馏水，即 10 μmol/mL NADH 标准品。-20℃保存 4 周，避免反复冻融。

产品说明：

SDH（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。SDH 催化山梨醇脱氢生成果糖，同时还原 NAD⁺生成 NADH，生成的 NADH 能将电子传递给 NBT 生成紫色的甲臞，根据这一原理可以计算 SDH 活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 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（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例加入提取液（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000×g 4℃离心 10 min，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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000 ×g 4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。





3、血清（浆）样本：直接检测。

二、测定步骤

1、可见分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 570 nm，蒸馏水调零。

2、标准管的测定：将 10 $\mu\text{mol/mL}$ NADH 标准品用水稀释至 1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液

(1) 标准品稀释表

序号	稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
1	10	100	900	1
2	1	180	20	0.9
3	1	160	40	0.8
4	1	140	60	0.7
5	1	120	80	0.6
6	1	100	100	0.5
7	1	80	120	0.4
8	1	60	140	0.3

下述实验中每个标准管需 100 μL 标准溶液（注意不要在此步骤直接检测标准溶液吸光度）。

(2) 标准品测定表

试剂名称(μL)	标准管	空白管
标准溶液	100	-
蒸馏水	-	100
试剂二	150	150
试剂三	150	150
试剂一	600	600

混匀后室温避光放置 20 min，之后分别测定标准管和空白管在 570 nm 下的吸光度，记为 A 标准管、A 空白管，计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。标准曲线只需做 1-2 次。

3、样本的测定：

试剂名称(μL)	测定管
样本	100
试剂二	150
试剂三	150
试剂一	600

将上述试剂按顺序加 1 mL 玻璃比色皿中，加试剂一的同时开始计时，记录 10 秒时的初始吸光度 A1，比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）水浴中准确反应 3 分钟；迅速取出比色皿并擦干，570 nm 下比色，记录 3 分 10 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A2 - A1$ 。（整个实验过程要避光）

三、SDH 活性计算

1、标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ （y， $\Delta A_{\text{标准}}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测}}$



定 (y, ΔA 测定) 带入公式计算样本浓度 (x, μmol/mL)。

2、SDH 活性计算:

(1) 血清(浆) SDH 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。

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

(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。

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

2) 按样本质量计算

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。

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

3) 按细菌或细胞数量计算

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。

$$\text{SDH (U/10}^4 \text{ cell)} = 1000 \times x \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.666 \times x$$

V 样: 加入样本体积, 0.1 mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 3 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; 1000: 单位换算系数, 1 μmol=1000 nmol。

注意事项:

1. ΔA 大于 0.7 时, 建议将样本用提取液稀释后测量, 计算公式中乘以稀释倍数。

2. 测定过程中样本和工作液在冰上放置, 以免变性和失活。

3. 比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C, 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水, 将此烧杯放入 37°C 或 25°C 水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。

相关发表文献:

- [1] Zhang X, Liang S, Wu Q, Charles TC, He R, Wu J, Zhao Y, Zhao Z, Wang H. Mode of action of nanochitin whisker against *Fusarium pseudograminearum*. *Int J Biol Macromol*. 2022 Sep 30;217:356-366. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.056. Epub 2022 Jul 14. PMID: 35839953.
- [2] Nie X, Hong C, Wang Q, Lu M, An H. Sugar composition and transcriptome analysis in developing 'Fengtang' plum (*Prunus salicina* Lindl.) reveal candidate genes regulating sugar accumulation. *Plant Physiol Biochem*. 2023 Sep;202:107955. doi: 10.1016/j.plaphy.2023.107955. Epub 2023 Aug 11. PMID: 37603969.

参考文献:

- [1] Aguayo M F, Ampuero D, Mandujano P, et al. Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant science*, 2013, 205: 63-75.

相关系列产品:

- BC2450/BC2455 植物组织果糖 (FT) 含量检测试剂盒
- BC2540/BC2545 纤维素酶 (CL) 活性检测试剂盒
- BC2510/BC2515 海藻糖酶 (THL) 活性检测试剂盒





BC2520/BC2525 山梨醇含量检测试剂盒

