

莽草酸脱氢酶（SD）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: BC4180

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	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×2 瓶	-20℃保存

溶液的配制:

- 1、提取液: 内含不溶物, 用前摇匀。
- 2、试剂二: 临用前加入 10 mL 蒸馏水溶解。
- 3、试剂三: 临用前每瓶加入 11 mL 蒸馏水溶解。
- 4、工作液的配制: 根据用量按照试剂一: 试剂二: 试剂三为 7:4:8 的体积比例充分混匀, 现用现配, 用前 25℃ 预热 15min。

产品说明:

莽草酸途径是存在于植物和微生物中的一条重要的代谢途径, 莽草酸脱氢酶(EC 1.1.1.25) 是莽草酸合成代谢途径中催化第四步反应的关键酶。

莽草酸脱氢酶催化莽草酸和NADP产生NADPH, 检测340nm下的吸光值增加速率来表示SD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。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、1mL石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、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、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 (加入前摇匀)) 进行冰浴匀浆, 然后 8000g, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
- 2、细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细胞数量(10^4 个): 提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 8000g, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
- 3、液体: 直接检测。

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计预热30min以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。





2、工作液25℃预热10min以上。

3、操作表：在1mL石英比色皿中分别加入下列试剂：

试剂名称	空白管	测定管
工作液 (μL)	950	950
样本 (μL)	-	50
蒸馏水 (μL)	50	-

加入样本即开始计时，充分混匀后于 340nm 处测定 20s 时的吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2，计算 ΔA 测定管=A2 测定-A1 测定， ΔA 空白管=A2 空白-A1 空白， $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管（空白管只需做 1-2 次）。

三、SD酶活计算

1、按样本蛋白浓度计算

酶活定义：每毫克蛋白每分钟产生1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{SD酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算

酶活定义：每克样本每分钟产生1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{SD酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算

酶活定义：每10⁴个细胞每分钟产生1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SD酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T \\ &= 643 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

4、按液体体积计算

酶活定义：每mL液体样本每分钟产生1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{SD酶活 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A$$

ϵ : NADPH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 1mL石英比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1 \times 10^{-3} \text{ L}$; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.05mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; T : 反应时间, 5min; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL。

注意事项:

1. 样本提取上清液置于冰上待测，且样本提取完成后建议2h内测完。
2. 样本的蛋白浓度需自行测定，由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以测定样本蛋白浓度时需扣除提取液自身蛋白浓度。
3. ΔA 大于1时，建议将样本稀释后再进行测定。当 ΔA 小于0.01时，可以延长反应时间（10min或15min）来测定。
4. 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过0.01。

实验实例:

1. 取0.1g萝卜叶，加入1mL提取液，进行样本处理，取上清按照测得步骤操作，测得计算 ΔA 测定管=A2测定-A1测定=1.441-1.201=0.24， ΔA 空白管=A2空白-A1空白=0， $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.24，按照样本质量计算得：SD酶活 (U/g 质量) = $643 \times \Delta A \div W = 1543.2 \text{ U/g 质量}$ 。





Solarbio®
LIFE SCIENCES

北京索莱宝科技有限公司

Beijing Solarbio Science & Technology Co.,Ltd.

相关系列产品:

BC2030/BC2035 异柠檬酸裂解酶 (ICL) 活性检测试剂盒

BC3170/BC3175 乙酸激酶 (ACK) 活性检测试剂盒



Tel: 400-968-6088

<https://www.solarbio.com>

E-mail: sales-china@solarbio.com

Address: No. 85, Liandong U Valley, Middle Zone, 101102, Tongzhou Dist, Beijing, China