

莽草酸脱氢酶 (SD) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10652

规格: 100T/96S

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, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C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 5 mL 蒸馏水溶解。
- 3、试剂三: 临用前每瓶加入 10 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, 备用, 用前 25°C 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。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:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、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°C, 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°C, 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/酶标仪预热30min以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。

2、操作表：在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入下列试剂

试剂名称	空白管	测定管
工作液 (μL)	190	190
样本 (μL)		10
蒸馏水 (μL)	10	
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，ΔA=ΔA 测定管-ΔA 空白管（空白管只需做 1-2 次）。		

三、SD酶活计算

A、按微量石英比色皿计算：

1. 按蛋白浓度计算

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样每分钟产生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, 6.22×10³L/mol /cm; d: 比色皿光径, 1cm; V反总: 反应体系总体积, 2×10⁻⁴L; V样: 反应体系中样本体积, 0.01mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 5min; 10⁹: 单位换算系数, 1mol=10⁹nmol; V样总: 加入提取液体积, 1mL。

B、按96孔UV板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm（96孔板光径）进行计算即可。

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1 mg/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稗草，加入1mL提取液，进行样本处理，取上清按照测得步骤操作，用微量石英比色皿测得计算ΔA测

定管=A2测定-A1测定=0.2771-0.2433=0.0338, ΔA 空白管=A2空白-A1空白=0, $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.0338,
按照样本质量计算得:

SD酶活 (U/g 质量) = $643 \times \Delta A \div W = 217.334$ U/g 质量。