

6-磷酸山梨醇脱氢酶(S6PDH)-醛糖 6-磷酸还原酶(A6PR)

紫外法 48 样

产品简介:

6-磷酸山梨醇脱氢酶 (S6PDH, EC 1.1.1.200) 又称醛糖 6-磷酸还原酶 (Aldose-6-phosphate reductase, A6PR), 催化 D-山梨糖醇 6-磷酸和 D-葡萄糖 6-磷酸之间的相互转化。研究发现该酶在苹果叶片等蔷薇科植物中广泛分布, 其在山梨醇合成中起着重要作用。

6-磷酸山梨醇脱氢酶 (S6PDH) 催化 D-葡萄糖 6-磷酸还原, 并使还原型辅酶 II (NADPH)

氧化。因此, 通过检测 340nm 下 NADPH 的下降速率, 即可得出 S6PDH 的酶活性大小。该酶催化的反应: $D\text{-sorbitol 6-phosphate} + NADP^+ = D\text{-glucose 6-phosphate} + NADPH + H^+$ 。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	4℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支分别加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL

			蒸馏水溶解备用。
--	--	--	----------

所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

6-磷酸山梨醇脱氢酶（S6PDH）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

[注]：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

2、上机检测：

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 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管
样本	40
试剂一	20
试剂二	680
混匀，室温（25℃）下孵育 10min	

试剂三	20
混匀，室温(25℃)下，于 340nm 处读取 A1，10min 后读取 A2。Δ A=A1-A2。	

[注]: 1. 若 10s 后反应体系未稳定可延长到 1min 再读值。

2.若 ΔA 在零附近,可适当延长反应时间 T 至 20min 或更长读取 A2, 或适当加大样本量 V1 (如增至 60 μ L, 则试剂二相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

3. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量 V1, 则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃离心 10min, 上清液用于检测

4. 若 ΔA 大于 0.3, 需减少反应时间 T (如减至 5min), 则改变后的 T 需代入公式重新计算。

5. 若下降趋势不稳定, 可以每隔 30S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S6PDH 活力(nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 305.5 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S6PDH 活力(nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 305.5 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入样本体积, 0.04mL;

V₂---反应体系总体积, 7.6×10

-4 L; d---光径, 1cm;

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10

3 L / mol /cm; W---样本质量, g;

T---反应时间, 10min;

C_{pr}---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。