

## 6-磷酸山梨醇脱氢酶(Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase) 活性说明书

(货号: G0575F 紫外法 48 样)

### 一、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:  $D\text{-sorbitol 6-phosphate} + NADP^+ = D\text{-glucose 6-phosphate} + NADPH + H^+$

### 二、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°C 保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	4°C 保存	使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°C 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	液体 40mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	粉剂 mg×1 支	4°C 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。

### 三、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。

### 四、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, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

#### 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°C 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 液体样本: 澄清的液体样本, 可直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

#### 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°C), 或可于水浴锅 (25°C) 中孵育 15-25min。

③ 试剂一和二可按照 20:680 比例配成混合液 (一枪加 700μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用); 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°C) 下孵育 10min	
试剂三	20
混匀, 室温 (25°C) 下, 于 340nm 处读取 A1, 10min 后读取 A2。ΔA=A1-A2。	

- 【注】** 1.若 10s 后反应体系未稳定可延长到 1min 再读值。
- 2.若  $\Delta A$  小于 0.01, 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 $\mu$ 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。
4. 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 $^{\circ}$ C 离心 10min, 上清液用于检测;
5. 若  $\Delta A$  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。
6. 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。

## 五、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。

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

### 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。

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

### 3、按液体体积计算:

单位定义: 每毫升液体在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{S6PDH 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 305.5 \times \Delta A \div W$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V2---反应体系总体积, 7.6 $\times 10^{-4}$  L;

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$  L/mol/cm;

T---反应时间, 10min;

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

V1---加入样本体积, 0.04mL;

d---光径, 1cm;

W---样本质量, g;